KARINE DE MELO SANTOS

Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas dietas de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade

Pirassununga - SP

2017

KARINE DE MELO SANTOS

**Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas dietas de cães adultos sobre
parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição e Produção
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto

Pirassununga - SP

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3550
FMVZ

Santos, Karine de Melo

Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas dietas de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade. / Karine de Melo Santos. -- 2017.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto.

1. Bactérias. 2. Canino. 3. Fermentativos. 4. Levedura. 5. Sistema imunológico. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos na dieta de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade", protocolada sob o CEUA nº 9148270415, sob a responsabilidade de **Márcio Antônio Brunetto e equipe; Karine de Melo Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/05/2015.

We certify that the proposal "Effects of including increasing levels of prebiotics in the adult dogs diet on the digestive parameters, fecal fermentation, microbiota and immunity.", utilizing 18 Dogs (18 males), protocol number CEUA 9148270415, under the responsibility of **Márcio Antônio Brunetto and team; Karine de Melo Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/13/2015.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2015](#) a [01/2017](#) Área: [Nutrição E Produção Animal](#)

Origem:

Espécie: [Cães](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [a](#)

N: [18](#)

Linhagem: [N/A](#)

Peso: [a](#)

Resumo: No intuito de promover a saúde e reduzir o risco de doenças, a nutrição de animais de companhia tem evoluído de forma semelhante à humana, na busca por alimentos funcionais. Neste sentido, os prebióticos podem ser bastante promissores. As *Saccharomyces cerevisiae* são leveduras com alta capacidade prebiótica, pois estimulam produção de substâncias com propriedades imunostimulatórias e aumentam a capacidade de prevenir a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal. Porém, sua composição determina a capacidade de atuação, baseado no substrato e meio em que foi nutrida. Assim, o processo de produção da levedura irá determinar sua intensidade de ação. Este estudo objetiva avaliar os efeitos de teores crescentes de leveduras com metabólitos ativos (LMA), baseada na fermentação de substratos específicos, na digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, microbiota e produtos da fermentação fecal e parâmetros imunológicos de cães adultos. Serão utilizados 18 cães, machos e fêmeas, adultos e saudáveis. Os animais serão distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos experimentais, denominados: DC (dieta controle), LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos). Nas amostras de fezes serão realizadas as análises de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada e ácido lático; microbiota, nitrogênio amoniacal, aminas biogênicas e substâncias voláteis. Para a determinação dos possíveis efeitos imunostimulatórios serão realizados os testes de fagocitose e burst oxidativo, linfoproliferação e imunofenotipagem de linfócitos. Os resultados obtidos serão analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004) e de acordo com a distribuição dos dados, testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos serão empregados.

Local do experimento:

São Paulo, 20 de março de 2017

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Karine de Melo

Título: Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas dietas de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Sônia e Selmo,

Ao meu companheiro Thiago Babesco,

Ao meu cãopanheiro Paraíba,

Por todo amor, carinho, apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sônia Maria Lima de Melo e Selmo Assis de Freitas Santos, que sempre me apoiaram em toda minha jornada, com muito carinho, amor, parceria e dedicação. Meus exemplos, meus ídolos, minha inspiração!

Ao meu irmão Hugo de Melo Santos, que sempre me faz rir e sentir como se fôssemos eternas crianças.

À minha avó Maria Neusa Lima de Melo (*in memoriam*), minha segunda mãe, fundamental na minha educação.

Ao Thiago Babesco de Carvalho Gallo, por embarcar nas minhas aventuras, por toda paciência (muita), companheirismo infinito, risadas, cantorias, loucuras e viagens.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto pela oportunidade, confiança, amizade, paciência e motivação que foram essenciais para a minha formação profissional e pessoal.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade.

À todos os docentes do Departamento de Nutrição e Produção Animal, os quais foram importantes para minha formação.

À todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal, em especial ao João Paulo de Oliveira Barros, Ana, Renata Maria Consentino Conti, Simi Luiza Durante Aflalo e Lucinéia Mestieri.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo Fapesp 2015/05493-0).

À Premier Pet, por possibilitar a produção das dietas e utilização de sua estrutura de pesquisa para condução deste estudo.

À toda equipe da Premier Pet: Cristiana Pontieri, Juliana Jeremias, Danilo Souza, Iris Kawauchi, Paula Takeara, Mariana Monti, Brown, Juliana, Suzana, Leda e Claudemir por todo auxílio e paciência na execução do experimento.

À Profa. Dra. Beatriz de Abreu Glória e todos os membros do Laboratório de Bioquímica dos Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, pela disponibilidade e auxílio com as determinações de aminos biogênicos.

À Profa. Dra. Maria Regina Cattai de Godoy e todos os membros do Laboratório de Zootecnia do Departamento de Zootecnia da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign, por todo auxílio nas análises de microbiologia, atenção, disponibilidade e amizade.

À Profa. Cristina de O. Massoco Salles Gomes e todos os membros do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, por todo auxílio nas análises de parâmetros imunológicos.

Aos membros do GENP (Grupo de Estudos em Nutrição Pet): Mariane Ceschin Ernandes, Patrícia Massae Oba, Laura de Oliveira Fantucci Matheus, Maria Isabel Gonzalez Urrego, Cláudio Galeno Piantino, Thiago Vendramini, Beatriz Kiihl Roque, Maria Cecília Lanchote e Andressa do Amaral e aos agregados Johnny Maciel de Souza e Janaina Cristina da Silva pela colaboração, conversas, risadas, conhecimentos compartilhados e convivência.

À Maria Isabel Gonzalez Urrego, por todo o auxílio na condução deste estudo, mas principalmente por ter se tornado uma grande amiga e companheira de todas as horas. Rumo ao Caribe e além!

Aos meus inspiradores de profissão, Pelúcia (*in memorian*), Black (*in memorian*), Suzi (*in memorian*), Paraíba, aos quais serei eternamente grata pelo amor incondicional.

Agradeço a todos os cães que participaram do presente estudo: Blue, Mili, Mel, Aladin, Aila, Simba, Apolo, Areta, Lucy, Olivia, Yuri, Marley, Edward, Yuki, Thor, Theo, Akiles, Yoko, do Canil do Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premier Pet, por terem colaborado com o experimento.

Obrigada a todos

“Fui à floresta porque queria viver intensamente, sugar a essência da vida. Eliminar tudo o que não era vida, e, não ao morrer, descobrir que não vivi. ”

(Henry Thoreau)

“Carpe Diem, *quam minimum credula postero*”

(Horácio Flaco 65 a.C.-8 a.C.)

RESUMO

SANTOS, K. M. **Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas dietas de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade.** [Effects of the inclusion of increasing levels of prebiotics in adult dogs on the digestive parameters, fecal fermentation, microbiota and immunity]. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

No intuito de promover a saúde e reduzir o risco de doenças, a nutrição de animais de companhia tem evoluído de forma semelhante à humana, na busca por alimentos funcionais. Neste sentido, as *Saccharomyces cerevisiae* são leveduras com potencial prebiótico, pois podem estimular a produção de substâncias com propriedades imunoestimulatórias e aumentar a capacidade de prevenir a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal. Porém, a composição e processo de produção podem influenciar na sua capacidade de atuação. Este estudo objetivou avaliar os efeitos da inclusão de teores crescentes de leveduras com metabólitos ativos (LMA) dietéticos na digestibilidade aparente dos nutrientes, microbiota e produtos da fermentação fecal e parâmetros imunológicos de cães adultos. Foram utilizados 18 cães adultos hígidos, machos e fêmeas, peso corporal médio de $15,8 \pm 7,37$ kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado constituído de três tratamentos experimentais, denominados: DC (dieta controle), LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos). As médias dos resultados obtidos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no SAS. Pôde-se verificar que a inclusão do aditivo alterou a digestibilidade aparente da fibra bruta, da proteína bruta, extrativos não nitrogenados e energia metabolizável ($p < 0,05$). Os produtos de fermentação não foram afetados pelo aumento da inclusão do prebiótico ($P > 0,05$). O índice de fagocitose foi maior nas dietas LMA 0,3 e LMA 0,6 ($P < 0,05$). Nas dosagens de LMA 0,3 e 0,6 as concentrações fecais de *Prevotella*, *Allobaculum*, *Fusobacterium* reduziram e *Clostridium* aumentaram ($p < 0,05$). *Collinsella* aumentou em LMA 0,6 ($p < 0,05$). *Blautia* apresentou tendência de aumento em LMA 0,3 e 0,6 e *Lactobacillus* em LMA 0,3 ($p < 0,10$). De acordo com os teores de inclusão e os parâmetros avaliados neste estudo, o aditivo pode apresentar possível efeito na imunidade inata e inespecífica e promover modestas alterações na microbiota fecal de cães adultos saudáveis.

Palavras-chave: Bactérias. Canino. Fermentativos. Levedura. Sistema imunológico.

ABSTRACT

SANTOS, K. M. **Effects of the inclusion of increasing levels of prebiotics in adult dogs on the digestive parameters, fecal fermentation, microbiota and immunity.** [Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas dietas de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade]. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

In order to promote health and reduce the risk of diseases, pet nutrition has evolved in a similar way to human, in the search for functional foods. In this sense, *Saccharomyces cerevisiae* are yeasts with high prebiotic capacity, since they stimulate the production of substances with immunostimulatory properties and increase the capacity to prevent the colonization of pathogenic bacteria in the gastrointestinal tract. However, its composition and production process determine the ability to act, based on the substrate and medium in which it was nourished. The objective of this study was to evaluate the effects of increasing levels of yeast with active metabolites (YAM), based on the fermentation of specific substrates, on the apparent digestibility of dietary nutrients, fecal fermentation products, microbiota, and immunological parameters of adult dogs. Eighteen adult healthy male and female dogs with a mean body weight of 15.8 ± 7.37 kg were distributed in a completely randomized design consisting of three experimental treatments: CD (control diet), YAM 0.3 (control diet with 0.3% of yeasts with active metabolites) and YAM 0.6 (control diet with 0.6% of yeasts with active metabolites). The mean of the obtained results were compared by the Tukey test ($p < 0.05$) in the SAS. It can be verified that the inclusion of the additive altered the apparent digestibility of crude fiber, crude protein, nitrogen free extract and metabolizable energy ($p < 0.05$). Regarding the fermentation products, they were not affected by the prebiotic ($P > 0.05$). The phagocytosis index was higher in the diets YAM 0.3 and YAM 0.6 ($P < 0.05$). At the dosages of YAM 0.3 and 0.6, fecal concentrations of *Prevotella*, *Allobaculum*, *Fusobacterium* reduced and *Clostridium* increased ($p < 0.05$). *Collinsella* increased with YAM 0.6 ($p < 0.05$). *Blautia* tended to increase with YAM 0.3 and 0.6 and *Lactobacillus* with YAM 0.3 ($p < 0.10$). According to the inclusion levels and the parameters evaluated in this study, the additive may present a possible effect on innate and nonspecific immunity and promote modest changes in the fecal microbiota of healthy adult dogs.

Keywords: Bacteria. Canine. Fermentative. Yeast. Immune system.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmula das dietas experimentais.....	30
Tabela 2. Composição química analisada ¹ das dietas experimentais	31
Tabela 3. Ingestão de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia metabolizável das dietas experimentais	43
Tabela 4. Concentração de ácido láctico, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, aminas biogênica e pH das fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais	46
Tabela 5. Porcentagem de ocorrência dos compostos orgânicos voláteis (COVs) nas fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais	48
Tabela 6. Média percentual da área dos picos dos compostos orgânicos voláteis mais abundantes presentes nas fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais	49
Tabela 7. Filos bacterianos proeminentes (expresso em porcentagem das sequências totais) nas fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais	53
Tabela 8. Gêneros bacterianos proeminentes (expressos em porcentagem das sequências totais) em fezes de cães alimentados com DC = dieta controle; LMA 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LMA 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos	55
Tabela 9. Resultados da imunofenotipagem de linfócitos, teste de fagocitose, proliferação e burst oxidativo dos cães alimentados com as dietas experimentais	57

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais	29
Quadro 1. Estudos publicados que avaliaram o uso de prebióticos na digestibilidade dos nutrientes, produtos da fermentação fecal, microbiota e imunidade em cães e gatos	40
Figura 2. Diversidade alpha - curvas de rarefação baseadas nas unidades operacionais observadas (observed OTU), distâncias filogenéticas (PD whole tree) e métricas (Chao1) de acordo com a dieta consumida pelos animais.....	51
Figura 3. Diversidade beta – análise das coordenadas principais (PCoA) da parcela não ponderada da fração única métrica (Unifrac) de acordo com a dieta consumida pelos animais	52
Figura 4. Diversidade beta - análise das coordenadas principais (PCoA) da parcela ponderada da fração única métrica (Unifrac) de acordo com a dieta consumida pelos animais.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1 REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1 Leveduras	18
1.2 Prebióticos	19
1.3 Microbiota.....	21
1.4 Produtos de fermentação.....	24
1.5 Imunologia	26
2 OBJETIVO	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Local de condução do ensaio	28
3.2 Animais.....	29
3.3 Delineamento experimental	29
3.4 Dietas experimentais.....	29
3.5 Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e escore fecal	31
3.6 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada e ácido lático	32
3.7 Determinação do pH fecal	33
3.8 Determinação de aminas biogênicas.....	33
3.9 Determinação de nitrogênio amoniacal nas fezes.....	34
3.10 Avaliação de compostos orgânicos voláteis nas fezes.....	35
3.11 Determinação da concentração fecal de bactérias pelo tecnologia de sequenciamento Illumina.....	36
3.12 Teste de fagocitose e burst oxidativo.....	37
3.13 Teste de linfoproliferação	37
3.14 Imunofenotipagem de linfócitos	37
3.15 Análises estatísticas	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Digestibilidade aparente dos nutrientes, ingestão de alimento e variáveis fecais	43

4.2	Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada, nitrogênio amoniacal, ácido láctico e aminas biogênicas.....	45
4.3	Determinação de compostos orgânicos voláteis nas fezes.....	47
4.4	Determinação da concentração fecal de bactérias pelo tecnologia de sequenciamento Illumina.....	49
4.5	Avaliação da imunidade.....	56
5	CONCLUSÃO	58
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

O mercado pet tem produzido alimentos com maior valor agregado, graças ao desenvolvimento e uso de produtos de melhor qualidade, resultante do amadurecimento e “humanização” do setor (AMBROZINI, 2007). Mais recentemente, o foco tem sido direcionado para obtenção de dietas balanceadas que maximizem a expectativa e a qualidade de vida pela utilização de ingredientes que desenvolvam a capacidade de resistir à doenças e melhorar a saúde (TZORTZIS et al., 2003).

Semelhante à nutrição humana, a nutrição canina está em ampla evolução e os nutricionistas buscam ingredientes funcionais que ofereçam benefícios além da nutrição básica (MIDDELBOSS et al., 2007). Dentre as pesquisas mais promissoras nesta área, estão os alimentos que atuam no metabolismo de macronutrientes, possuem efeitos antioxidantes e que promovem benefícios à saúde do trato gastrointestinal (FAHEY, 2003).

Os alimentos funcionais possuem benefícios adicionais aos da nutrição convencional, como a possibilidade de redução dos riscos de doenças ou promoção da saúde, devido aos componentes fisiologicamente ativos inclusos (ROBERFROID, 2002). Estes componentes podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (GIBSON & ROBERFROID, 1995; PELÍCIA et al., 2004), como no caso dos prebióticos, que podem promover a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro (MACARI & MAIORKA, 2000) pelo estímulo do crescimento e/ou ativação do metabolismo de determinados grupos de bactérias do trato gastrointestinal (MARTINS, 2009).

Quando comparada com outros organismos prebióticos, as leveduras possuem como vantagem a capacidade de assimilar grande variedade de substratos em alta velocidade de crescimento e com facilidade de separação de sua biomassa (ICIDCA, 1999). No entanto, sua composição química é dependente de fatores como tipo de substrato, aeração do meio, espécie de levedura, tratamento do meio de cultura, concentração de sais, entre outros (BUTOLO, 2010).

Neste sentido, as diferenças entre os tipos de partículas e forma de obtenção da *Saccharomyces cerevisiae*, devem ser consideradas para sua atuação prebiótica. Alterações na sua composição podem influenciar vários fatores ligados à imunidade, microbiota intestinal e fermentação fecal.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leveduras

As leveduras são organismos eucariotos unicelulares, classificados como fungo. A morfologia, o modo de reprodução e o substrato metabolizado, são fatores que diferenciam as espécies (STONE, 2006). Apesar de compartilharem características comuns como eficiência na utilização do açúcar, alta taxa de fermentação, produção, rendimento e tolerância ao etanol (SWANSON & FAHEY, 2006; SWANSON & FAHEY, 2007). As leveduras se diferenciam segundo sua cepa, fração utilizada e características como teor de umidade, proteína bruta e atividade fermentativa, definição usada pela AAFCO (2009) para diferenciar seus produtos.

As *Saccharomyces cerevisiae* são usadas na produção de pães, cervejas, vinho e destilados, de acordo com suas cepas. Nas cervejarias e destilarias de álcool (etanol) os excedentes de células de levedura gerados, são inativados pela temperatura ou podem ser usadas diretamente (células íntegras de levedura) ou processadas para obtenção de vários derivados (RAMOS et al., 2011). Devido a necessidade em se utilizar os excedentes da biomassa microbiana e agregar valor ao produto, as leveduras e seus componentes não tem sido considerados subprodutos, pois a indústria tem objetivado a produção de leveduras com elevado potencial prebiótico, para serem incorporadas na nutrição humana e animal.

O potencial prebiótico da *Saccharomyces cerevisiae* está relacionado à composição química de sua parede celular, que é um substrato moderadamente fermentável, no qual contém uma mistura de carboidratos e proteínas. (OFEK et al., 1977; NEESER et al., 1986). A parede celular da levedura (PCL) é composta por duas frações: uma mais interna, formada por β 1,3 glucano; β 1,6 glucano e quitina, e outra, mais externa, constituída por manonoproteínas formadas parcialmente por mananoligossacarídeo (MIDDELBOSS et al., 2007). Sgarbieri et al. (1999) relataram que a levedura possui entre 40-45% do peso da célula em base da matéria seca de PCL e por sua vez, esta possui entre 30 - 60% de glucanos, 25 a 50% de mananos, 13 a 15% de proteína, 2 a 14% de lipídio e 1 a 2% de quitina (Fleet et al., 1991). Os componentes restantes da levedura contém numerosos nucleotídeos, enzimas, vitaminas e minerais.

Glucanos e mananoligossacarídeos podem apresentar efeitos positivos no sistema imunológico e também aumentar a capacidade de prevenir a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (CAMPOS NETO, 1987). Os mananoligossacarídeos da parede celular da levedura são fermentados pelos cães (VICKERS et al., 2001) e podem elevar

as populações de lactobacilli (SWANSON et al., 2002a) e bifidobacteria fecal (GRIESHOP et al., 2004). Os mananos parecem prevenir a aderência de bactérias que expressam fimbrias tipo 1 (patógenas) na parede intestinal, preservando a integridade da superfície de absorção intestinal (ROBERFROID, 2002).

O β -glucano é uma substância há muito tempo usada na medicina humana e já foi demonstrado seu potencial imunomodulador em cães e gatos, segundo alguns estudos (ZAINÉ et al., 2014). Esse polissacarídeo age desencadeando ações que parecem ter efeito benéfico contra uma variedade de bactérias, vírus, fungos e parasitas (HUNTER JUNIOR et al., 2002; MANTOVANI et al., 2008). Pois é reconhecido por receptores presentes na superfície celular encontrados em macrófagos/monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células *natural killer* (NK) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; BROWN; GORDON, 2001).

Os nucleotídeos são substâncias compostas por uma base nitrogenada, um açúcar pentose e um ou mais grupos fosfatos e participam de vários processos bioquímicos fundamentais ao funcionamento do organismo (LEHNINGER et al., 1995). Os mecanismos no qual os nucleotídeos dietéticos atuam no sistema imune ainda não são claros, mas acredita-se que desempenhem um papel fundamental. Sua importância seria atender o *turnover* intenso de ácidos nucleicos durante a rápida divisão mitótica em resposta ao antígeno, em linfócitos normais que apresentam capacidade limitada na síntese de ácidos nucleicos (WESTWOOD, 1999).

Pode haver grande variação entre os produtos de diferentes empresas produtoras de levedura, de acordo com o substrato, líquidos e cereais selecionados para a fermentação. No caso das leveduras com metabólitos ativos, além das células residuais, estas apresentam o meio de fermentação e metabólitos. Desta forma, apresentam teores diferenciados de resíduos celulares, componentes da parede celular, nucleotídeos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais e polifenóis, características estas que podem influenciar na modulação da microbiota intestinal e no *status* inflamatório e imunológico.

1.2 Prebióticos

Por definição, prebiótico é um ingrediente fermentado de forma seletiva que permite mudanças específicas, tanto na composição e/ou atividade na microbiota gastrointestinal, que confere benefícios à saúde e bem-estar do hospedeiro (ROBERFROID, 2002). Para ser classificado como prebiótico, essas substâncias devem apresentar como características:

incapacidade de ser digerida ou parcialmente pelo hospedeiro, não absorvível no intestino delgado, pouco fermentável por bactérias orais e patogênicas do trato gastrointestinal e, potencial em ser fermentado por microrganismos benéficos (CRITTENDEN e PLAYNE 2009).

A principal forma de ação dos prebióticos é sobre a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro (MACARI & MAIORKA, 2000), através do estímulo do crescimento e/ou por ativação do metabolismo de algum grupo de bactérias do trato intestinal. De forma geral, O'Toole e Cooney (2008) relataram que as cepas de bactérias benéficas agiriam sobre a microbiota patogênica pela competição por nutrientes; produção de compostos fermentativos com efeito inibitório; produção de vitaminas e substratos de crescimento para outras bactérias benéficas; produção de bacteriocinas e enzimas; competição pelos sítios de ligação; redução da inflamação e estímulo ao sistema imune inato.

Os prebióticos podem estar presentes nos ingredientes das dietas ou serem adicionados através de fontes exógenas concentradas (GIBSON & ROBERFROID, 1995; PELICIA et al., 2004). O fato de serem não digeríveis e fermentáveis não significa que atuem como prebióticos. Apesar de existirem vários compostos resistentes à digestão por ácidos, sais e enzimas produzidos pelo organismo animal (celulose, hemicelulose, amido resistente, oligossacarídeos, compostos fenólicos, etc.), sendo alguns deles potencialmente fermentáveis, nem todos agem como estimuladores no desenvolvimento dos microrganismos benéficos no TGI. Algumas substâncias quando ingeridas estimulam o crescimento e/ou a atividade metabólica de diferentes espécies bacterianas, incluindo espécies potencialmente nocivas (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Devido a maior seletividade fermentativa dos oligossacarídeos não digestíveis (ONDs), eles tem sido preferencialmente usados como prebióticos (da SILVA & NORNBERG, 2003).

Os oligossacarídeos não digeríveis e as fibras dietéticas são os principais substratos de crescimento dos microrganismos intestinais. Tais compostos estimulam o crescimento da população microbiana, como as *Bifidobacterias* e os *Lactobacillus* que são considerados benéficos à saúde humana (BLAUT, 2002). Prebióticos são adicionados à dieta com o objetivo de estimular o crescimento e a estabilidade das populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos [ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido lático], em relação aos demais. Estes produtos de fermentação reduzem o pH luminal e, juntamente com outras substâncias antibacterianas e enzimas produzidas por esta mesma microbiota, podem inibir a proliferação dos microrganismos nocivos, tais como *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella*.

Frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS), podem ser utilizados como inibidores do crescimento de bactérias patogênicas como *Salmonella* e *Escherichia coli*, pois são microrganismos gram negativos que podem ter sua capacidade de fermentação e crescimento reduzidos com a presença desses compostos (FLEMMING, 2005; GOMES, 2009).

Grieshop et al. (2004) observaram aumento nas concentrações fecais de *bifidobateria* em cães idosos alimentados com dietas suplementadas com MOS e/ou Chicória (Controle; 1% chicória; 1% MOS; 1% chicória + 1% MOS) e redução nas concentrações fecais de *E. coli* nos suplementados com MOS. Em cães, Middelbos et al. (2007a) incluíram teores crescentes de PCL (0%; 0,05%; 0,25%; 0,45% e 0,65%) na dieta e observaram que pela técnica de plaqueamento, *Clostridium perfringens* apresentou tendência cúbica em redução e a *E. coli* redução linear significativa, o que foi atribuído a afinidade do MOS. No mesmo estudo, quando empregada técnica molecular, verificou tendência ao comportamento cúbico para *Lactobacillus spp.* e *E. coli* com as maiores contagens, nas dosagens 0,05% e 0,45%. Ao avaliarem a suplementação de dietas com FOS e/ou MOS (Controle; 1 g FOS/200g dieta; 1 g MOS/200g dieta; 1 g FOS + 1 g MOS/200g dieta) em cães, Swanson et al. (2002c) observaram que cães suplementados com MOS apresentaram menor contagem de aeróbicos totais e tenderam a apresentar maior população de *Lactobacillus*.

1.3 Microbiota

A microbiota gastrointestinal é um ecossistema complexo composto por centenas de espécies de bactérias, algumas são potencialmente patogênicas, enquanto outras são consideradas benéficas para o hospedeiro (ROBERFROID et al., 1998). Semelhante ao observado em seres humanos, uma comunidade de microrganismos intestinais pode contribuir para distúrbios intestinais em cães e gatos, não apenas devido à invasão dos enteropatógenos no TGI, mas também devido à participação da microbiota intestinal em muitos processos importantes para o metabolismo do hospedeiro (por exemplo, metabolismo do ácido biliar, fermentação e utilização dos produtos de carboidratos não digeríveis e proteínas)(DENG & SWANSON 2015).

Pesquisas recentes tem demonstrado que a colonização do TGI pelos microrganismos pode iniciar na fase fetal, diferente do que se acreditava, em que a colonização ocorria no momento do parto. Assim, a presença de quaisquer bactérias no útero pode ser considerada

fator prejudicial ao feto (RODRÍGUEZ et al., 2015; SANTOS, 2015), o que pode influenciar no desenvolvimento imunológico do indivíduo (THUM et al., 2012; FUNKHOUSER & BORDENSTEIN, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015; SANTOS, 2015) devido a competição por sítios de ligação entre os microrganismos do TGI. O estabelecimento da microbiota intestinal se dá, de acordo com as experiências dietéticas, exposição a microrganismos e a exploração do ambiente por estes animais. As mudanças na composição da microbiota, resultantes em prevenção ou imprecisão de desordens digestivas, serão determinadas pela nutrição subsequente. O perfil da microbiota residente pode ser influenciado pela utilização de ingredientes alimentares como: fontes de fibras, prebióticos, enzimas, probióticos e acidificantes (WENK, 2006).

Ao se formular alimentos para estas espécies, deve ser considerado que o mesmo deve prover nutrientes para o indivíduo e para as bactérias residentes no TGI (BUDDINGTON & SUNVOLD, 2000). A mucosa intestinal é principalmente nutrida pelos compostos absorvidos no lúmen. Esses compostos advêm dos ingredientes da dieta ou são produzidos pela microbiota intestinal (TESHIMA, 2003). Vitaminas, aminos e ácidos graxos de cadeia curta, que possuem importante função para as células intestinas, são compostos produzidos a partir do metabolismo bacteriano (MIDDELBOS et al., 2007). Os carboidratos fermentáveis são componentes importantes das dietas de cães e gatos, pois sua adição proporciona suprimento adequado de matéria orgânica para o intestino grosso, com isso, ocorre o fortalecimento da mucosa intestinal e, redução do risco de translocação bacteriana e septicemia (CARCIOFI, 2005; NRC, 2006).

HUSSEIN et al. (1999) descreveram que a maior ocorrência de patógenos, pode ser influenciada pela fonte e quantidade de proteína dietética. As bactérias nocivas, podem causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos, aumentar produtos relacionados com a decomposição bacteriana de proteínas e propiciar o aparecimento de enfermidades (ZENTEK et al., 2003), como é o caso da *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Salmonella*.. Por outro lado, os gêneros de bactérias comensais mais estudados, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, podem auxiliar na digestão e absorção de nutrientes, produzem vitaminas que são utilizadas pelo hospedeiro e diminuem a proliferação de agentes patogênicos, por exclusão competitiva (da SILVA & NORNBERG, 2003).

A população microbiana do trato gastrointestinal de cães e gatos adultos possui grande variabilidade de espécies, existindo entre elas alta complexidade de interações para manutenção de seu ecossistema. De forma geral, Suchodolski et al. (2011) relataram que as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas ocorrem em grande abundância no intestino

delgado, enquanto que as anaeróbias predominam no intestino grosso. Na caracterização da composição bacteriana das fezes, em revisão de literatura, Deng e Swanson (2015) mencionaram que *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* são os filos bacterianos predominantes na microbiota fecal de cães e gatos. Com relação à avaliação conjunta de filos e gêneros bacterianos, Handl et al. (2011) relataram que dentro do filo *Firmicutes*, a classe *Clostridia* foi a predominante, com destaque para os grupos *Clostridium* e *Ruminococcus*, além disso as classes *Erysipelotrichi* e *Bacilli* foram relevantes. A classe *Bacilli* foi constituída quase que exclusivamente pela ordem *Lactobacillales*, principalmente os gêneros *Enterococcus spp.* e *Lactobacillus spp.*

As proporções das bactérias intestinais, além de apresentarem variações entre espécies, indivíduos, dieta e ambiente, podem ser influenciadas pela coleta e manipulação da amostra, método de extração do DNA e RNA, *primers* e técnica empregada (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; KERR; BELOSHAPKA; SWANSON, 2014; DENG; SWANSON, 2015; GRZESKOWIAK et al., 2015). O TGI de mamíferos é considerado um ambiente complexo e necessita de caracterização mais aprofundada. As técnicas de cultivo tradicionais usadas comumente são limitantes, pois são incapazes de cultivar e classificar a grande maioria dos microrganismos intestinais (GREETHAM et al., 2002). Desta forma, as ferramentas moleculares se tornaram um método padrão para investigar a microbiota intestinal de cães e gatos (SUCHODOLSKI, 2011).

As técnicas moleculares tais como a PCR são capazes de detectar de forma eficaz alterações individuais em espécies, desde que seja utilizado o *primer* apropriado. Estas espécies também podem ser quantificadas. No entanto, as espécies bacterianas enumeradas representam apenas uma pequena fração da microbiota total no trato gastrointestinal. Portanto, não são percebidas alterações em espécies bacterianas diferentes das quantificadas (MIDDELBOSS et al., 2007). O sequenciamento de alto rendimento *Illumina Fluidigm Array Technology* é uma técnica baseada em DNA, que permite avaliação abrangente da comunidade microbiana gastrointestinal, proporcionando amplo escopo do microbioma, o que seria impossível pelos métodos tradicionais. O sequenciamento de última geração e a disponibilidade de ferramentas de bioinformática podem gerar a classificação detalhada do rRNA 16S da microbiota intestinal (DEUSCH et al., 2014).

1.4 Produtos de fermentação

Embora a absorção pelo intestino delgado seja um processo eficiente, quantidades significativas de compostos nitrogenados, de origem exógena e endógena não são absorvidos pelo epitélio do intestino delgado, permanecendo no lúmen (BLACHIER et al., 2007; BOYE et al., 2012). Esses compostos são transportados para o intestino grosso, onde as bactérias realizam intensa proteólise, a qual resulta na liberação de peptídeos e aminoácidos que sofrem uma série de reações de oxidação e redução. Como produtos finais, são originados diversos compostos de putrefação, tais como a amônia, aminas, ácidos graxos de cadeia ramificada, indóis, fenóis e compostos sulfurados. Estes compostos orgânicos voláteis (COVs) são responsáveis pelo mal odor nas fezes dos cães e podem indicar diminuição da saúde gastrointestinal do animal (HUS0SEIN & SUNVOLD, 2000; ROUDEBUSH et al., 2010).

Por outro lado, o grande número de bactérias presentes no cólon (10^{10} por grama de fezes na matéria seca) apresenta importante participação na fermentação de carboidratos complexos que resulta na produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), considerados benéficos (ADAM, 2003). Os AGCC são importantes substâncias associadas à proliferação celular por seu papel no metabolismo energético dos colonócitos e estão dentre os produtos gerados na fermentação dos prebióticos (WALKER; DUFFY, 1998).

Os ácidos orgânicos de principal importância nutricional, produzidos pela microbiota, são os ácidos acético, propiônico e butírico, usualmente descritos como ácidos graxos de cadeia curta. O ácido acético e propiônico são prontamente absorvidos e entram na corrente sanguínea, sendo fonte de energia extra para o hospedeiro. O ácido butírico é a principal fonte de energia para os colonócitos, sendo importante regulador do crescimento e diferenciação celular (NRC, 2006). Os produtos intermediários da fermentação como o ácido láctico, succínico, pirúvico e o etanol são usualmente metabolizados a AGCC. Ácidos orgânicos de maneira geral têm atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias Gram negativas como *E. coli* e espécies de *Salmonella* e *Campylobacter* (ADAM, 2003). O ácido láctico em especial, trata-se de uma importante substância do metabolismo bacteriano, com capacidade de redução do pH e consequente diminuição de bactérias potencialmente patogênicas (CARBONERA; ESPIRITO SANTO, 2010).

Várias vias metabólicas estão presentes na formação dos AGCC. De forma sucinta, a síntese de ácido acético ocorre através da hidrólise do acetil-CoA, formado a partir do piruvato, que produz CO₂, o qual é convertido com grupo metil e CoA à acetil-CoA. Entretanto, a maior

parte do piruvato é convertido em acetil-CoA. Já na síntese de ácido propiônico, três vias metabólicas podem estar envolvidas, sendo elas: via do succinato, via da fucose e via do acrilato, pela rota do lactato. Na formação do ácido butírico, ocorre a reação inversa de beta oxidação, bem como duas rotas alternativas, a primeira pela ação da fosfotransbutirilase e butirato-quinase, e a segunda que emprega uma via de CoA-transferase, que transfere a fração CoA do butiril-CoA para o acetato. Em relação à última via, salienta-se que o acetato estimula a rota da CoA-transferase, para detoxificação de seu excesso, sendo que bactérias adaptadas para sobreviver em ambientes diferentes do lúmen intestinal possuem rota da butirato-quinase, a qual não depende de altas concentrações de acetato, o que pode permitir que estas bactérias sobrevivam a ampla gama de condições ambientais (LOUIS et al., 2007; BESTEN et al., 2013; SANTOS, 2015).

Dentre os fatores que influenciam a formação das aminas biogênicas em alimentos estão a disponibilidade de aminoácidos livres, sinergismo entre as aminas, armazenamento dos alimentos e a presença de microrganismos, como *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, entre outros (BARDÓCZ, 1995; SHALABY, 1996; BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999). No entanto, as carboxilases presentes nos microrganismos não são muito específicas e sua atividade é característica para as espécies e cepas bacterianas (BARDÓCZ, 1995).

As principais aminas biogênicas de importância são: feniletilamina, tiramina, triptamina, histamina, putrescina, espermina, espermidina, agmatina e cadaverina. Bover-Cid e Holzapfel (1999) observaram que espécies específicas de bactérias ácido lácticas, principalmente *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Carnobacterium* foram responsáveis por considerável formação de tiramina. As *Enterobacteriaceae* (dentre elas *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* e *Klebsiella*) estiveram associadas à formação de cadaverina e putrescina, de forma semelhante Bover-Cid et al. (2001) relacionaram espécies de *Lactobacillus* à tiramina, triptamina, feniletilamina, cadaverina e putrescina; *Enterococcus* à tiramina e feniletilamina, e *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*) à cadaverina e putrescina.

As aminas são classificadas em natural e biogênica, e de acordo com a função que exercem, estrutura química, número de grupamentos amina. As poliaminas (espermidina, putrescina e espermina) se destacam, pois possuem importante papel na síntese de DNA, RNA e proteínas, o que repercutiria no crescimento e renovação celular (BARDÓCZ, 1995).

1.5 Imunologia

O trato gastrointestinal é o principal lugar de interação entre o sistema imunológico e os microrganismos. Enquanto o sistema imune apresenta importante papel em manter a homeostase com a microbiota intestinal, bactérias que residem no intestino influenciam o desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino (*gut associated lymphoid tissue* – GALT) e modula a imunidade do animal (ROUND & MAZMANIAN, 2009). O GALT é o maior órgão imunológico do organismo, possuindo aproximadamente 80% das células de defesa do corpo e mais de 50% das células imunes efectoras (SWANSON & FAHEY, 2007).

O sistema imune da mucosa do TGI de cães consiste em estruturas linfóides organizadas, incluindo as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e a lâmina própria intestinal (STOKES; WALY, 2006). Nestes encontram-se tipos celulares específicos, como linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos (GERMAN; HALL; DAY, 1999). O GALT realiza as seguintes atividades: captura, processamento e apresentação dos antígenos ingeridos; produção de anticorpos locais, em especial IgA, ativação de respostas imunes citomediadas, particularmente as mediadas por linfócitos T CD8⁺ (células citotóxicas) e macrófagos.

Várias pesquisas demonstraram que as leveduras podem ser responsáveis por aumentar a resistência à infecções, pelo fato de possuírem componentes que aumentam a resposta imunológica e, dessa maneira, seriam consideradas como alimentos funcionais. As mananoproteínas e sua porção de carboidrato α -D-manano são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio-ambiente e determinam a especificidade imunológica de leveduras. De forma interessante, os dois principais polissacarídeos constituintes da parede celular das leveduras - β -D-glucanos e α -D-manano, têm sido recentemente reconhecidos como capazes de promover modulação do sistema imune de diversos organismos vivos, desde insetos a humanos, mediante interações específicas com diferentes células imunocompetentes (GARCIA, 2008).

A alteração da microbiota intestinal consequente ao uso de prebióticos pode ocorrer, basicamente, de duas maneiras: pelo fornecimento de nutrientes para as bactérias desejáveis e por exclusão competitiva. Assim, por estes dois mecanismos a colonização intestinal indesejável é reduzida resultando em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa intestinal. Para que as bactérias indesejáveis consigam colonizar o trato intestinal e criar condição de doença precisam inicialmente aderir-se à superfície epitelial dos enterócitos.

Esta adesão ocorre através das fímbrias bacterianas, que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Portanto, se as bactérias se ligarem a um açúcar ou oligossacarídeo dietético, e não à mucosa intestinal, irão passar com a digesta sem causar transtornos para os animais. A PCL é fonte natural destes oligossacarídeos não digestíveis (SILVA, 2006).

Os prebióticos atuam indiretamente de forma benéfica sobre o sistema imune do hospedeiro, ao estimularem o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico. Estas populações bacterianas produzem substâncias com propriedades imunoestimulatórias. Tais substâncias interagem com o sistema imune, promovendo a produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose macrofágica e indução de síntese de maiores quantidades de imunoglobulinas (MACFARLANE & CUMMINGS, 1999).

Por definição, o intervalo compreendido desde a internalização celular de uma partícula até sua digestão, é chamado de fagocitose. Os patógenos se ligam com receptores presentes na membrana celular (HENDERSON et al., 1993; INOUE et al., 1994), com isso os neutrófilos fagocitam o material particulado, o fagossomo se une com o lisossomo e produz estrutura denominada fagolisossomo. Os grânulos de estoque fundem-se ao fagolisossomo e o material englobado é degradado e produzem citocinas com função pró-inflamatória, como TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-8; e citocinas que modulam as atividades de linfócitos T e B, como o antagonista de receptor IL-1 e TGF- β . As membranas dos patógenos tornam-se permeáveis e são destruídas no processo chamado como *burst* oxidativo, devido a liberação de defensinas e oxidases que geram espécies reativas de oxigênio (ERO) (PIER, 2004). *Burst* oxidativo é a metabolização do oxigênio molecular a O_2^- pelo sistema NADPH oxidase, que induz o aumento no consumo de oxigênio não-mitocondrial e a formação de metabólitos reativos do oxigênio. Estas substâncias são fundamentais para a destruição de microrganismos ingeridos para as células fagocíticas. Já para as células não-fagocíticas, o metabolismo oxidativo aumentado indica ativação celular. Os métodos de citometria de fluxo para determinação do *burst* oxidativo têm como objetivo a mensuração das reações oxidativas intracelulares, de forma individual. As células são permeadas por uma substância precursora não-fluorescente, que é oxidada pelos componentes do *burst* oxidativo, a um produto fluorescente (ADAMSON & SLOCOMBE, 1995).

Os linfócitos são as células mais simples no aspecto morfológico. Em termos funcionais, são as mais distintas do sistema imunológico. Existem as células efetoras da imunidade adaptativa ou adquirida, que podem ser subdivididas em relação as suas moléculas

de superfície e função. Após o reconhecimento do antígeno cognato, entram em processo de ativação e proliferação e transformam-se em células efetoras ou de memória (PIER, 2004). Em cães, ZAINE (2010) verificou que a inclusão da parede celular de levedura (PCL) e frações purificadas da PCL concentrada em beta 1,3/1,6-glucano (BG1/BG2) na dieta resultou em efeitos interessantes na imunidade de cães. A imunofenotipagem revelou aumento dos linfócitos T totais, T helper, T citotóxicos e linfócitos B no grupo BG2 e de linfócitos T citotóxicos e linfócitos B para o grupo PCL. Os efeitos das mananoproteínas derivadas da parede celular de leveduras no processo de imunossenescência em cães idosos foi avaliado por Kroll (2014). Sua possível atuação imunomoduladora sobre a resposta imune e inata adquirida nos cães foi favorecida principalmente na inclusão de 0,04% na dieta, efeito evidenciado pelas maiores contagens de linfócitos T totais em relação ao grupo controle. Em seu estudo, GOMES (2009) concluiu que a adição de parede celular de levedura (PCL), apresentou efeito prebiótico, pela mudança na atividade metabólica da microbiota intestinal e imunoestimulante para cães. As populações de linfócitos pan T e linfócitos B aumentaram, mediante a ingestão de PCL.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de teores crescentes de levedura com metabólitos ativos na digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, microbiota, produtos da fermentação fecal e parâmetros imunológicos de cães adultos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução do ensaio

O presente estudo foi conduzido no Centro de Desenvolvimento Nutricional (CDN), da Premier Pet, localizado em Dourado, São Paulo, conjuntamente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP. Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela “Comissão de Ética no Uso de Animais” (CEUA) da FMVZ/USP (Protocolo nº 9148270415).

3.2 Animais

Foram utilizados 18 cães adultos, machos e fêmeas, castrados e não castrados, com peso médio de $15,8 \pm 7,37$ kg, idade média de $3,3 \pm 1,58$ anos, procedentes do CDN Premier Pet. O estado de saúde foi confirmado previamente ao início do experimento por meio de exames físico, sanguíneo e coproparasitológico.

3.3 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos experimentais, resultando em 6 repetições por tratamento. As avaliações realizadas durante a condução do ensaio experimental de acordo com cada fase estão ilustradas na figura 1.

Figura 1. Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais. AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; AGCR: ácidos graxos de cadeia ramificada; COVs: compostos orgânicos voláteis.
Fonte: Santos (2017)

Na fase de adaptação (primeiros 14 dias) os cães foram alojados em duplas (conforme o tratamento recebido) em canis com dimensões de 2,0 x 5,60m e solário de 2,0 x 4,90m, em área total de 11,2m², providos de cama, aquecedor e água *ad libitum*. Os animais foram separados no fim desta etapa e permaneceram em canis individuais durante as fases de digestibilidade e saúde intestinal. Os animais eram soltos individualmente durante uma hora todos os dias em espaços maiores, denominados áreas de exercício.

3.4 Dietas experimentais

Foi formulada uma dieta controle, de modo a atender as exigências da AAFCO (2012) para cães em manutenção, e a partir da mesma as inclusões de prebiótico foram desdobradas, conforme Tabela 1. Os tratamentos experimentais corresponderam a inclusão de duas diferentes doses de prebióticos, obtendo-se três dietas distribuídas da seguinte forma: DC (dieta controle); LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos).

Tabela 1. Fórmula das dietas experimentais

Ingredientes (%)	DC	LMA 0,3	LMA 0,6
Amido	1,00	0,70	0,40
Prebiótico	-	0,30	0,60
Milho grão	20,91	20,91	20,91
Farinha de vísceras de frango	36,00	36,00	36,00
Quirera de arroz	30,00	30,00	30,00
Gordura de aves	8,20	8,20	8,20
Palatabilizante líquido	2,00	2,00	2,00
Palatabilizante em pó	0,50	0,50	0,50
Cloreto de potássio	0,43	0,43	0,43
Sal comum	0,30	0,30	0,30
Premix min/vit ¹	0,52	0,52	0,52
Antifúngico	0,10	0,10	0,10
Antioxidante	0,04	0,04	0,04

¹Adição por quilograma de produto: Ferro 100mg, Cobre 10mg, Manganês 10mg, Zinco 150mg, Iodo 2mg, Selênio 0,3mg, Vitamina A 18000UI, Vit. D 1200UI, Vit. E 200UI, Tiamina 6mg, Riboflavina 10mg, Ácido pantotênico 40mg, Niacina 60mg, Piroxidina 6mg, Ácido fólico 0,30mg, Vit. B12 0,1mg e Colina 2000mg.

Após a formulação, os ingredientes foram pesados, moídos, homogeneizados e na sequência extrusados. Esta etapa (extrusão) foi realizada na Unidade Fabril da Premier Pet, Dourado – SP. Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, de modo a não permitir variabilidade entre os tratamentos. A composição química das dietas está apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Composição química analisada¹ das dietas experimentais

Item	Dietas ²		
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6
Matéria seca (%)	95,25	91,57	91,18
	Composição na ms		
Matéria mineral (%)	6,65	5,92	6,09
Proteína bruta (%)	35,66	31,25	33,37
EEHA (%)	15,63	16,38	14,36
ENN (%)	35,35	39,09	39,58
Fibra bruta (%)	6,71	7,36	6,59
Energia bruta (Kcal/g)	5,23	5,22	5,14

¹n=2(CV<5%); ²DC (dieta controle), LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos). EEHA= extrato etéreo em hidrólise ácida; ENN= extrativos não nitrogenados.

A quantidade de alimento fornecida aos animais foi baseada na equação de predição da necessidade energética do *National Research Council* - NRC (2006) para cães adultos em manutenção, calculada por $95 \times (PC)^{0,75} = \text{Kcal/dia}$. A quantidade total diária foi dividida em duas refeições iguais, oferecidas as 7:00 e 15:30 horas. Os comedouros foram removidos passados 30 minutos após o oferecimento das dietas. O consumo e as sobras de alimento foram mensurados e anotados durante todo o experimento. A água foi oferecida “ad libitum”.

3.5 Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e escore fecal

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foram determinados pelo método de coleta total de fezes, segundo recomendações da AAFCO (2009). Dessa forma, o consumo de alimento foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento em cada refeição. As fezes foram coletadas integralmente após totalização de 24 horas do fornecimento do alimento, durante sete dias. As fezes foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. Ao final do período de coleta, estas foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal (*pool* de fezes). Na sequência, foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. As fezes pré-secas e as dietas foram então moídas em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo, Brasil), com peneira de 1mm para proceder-se as análises laboratoriais.

Nas fezes e alimentos foram determinados, segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995), os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB). A energia bruta (EB) dos alimentos e fezes foi determinada em bomba calorimétrica (1281, PARR Instrument Company, Illinois, EUA). Para tal, as amostras de fezes e rações foram peletizadas e pesadas para se proceder a combustão. As análises foram conduzidas em duplicata e repetidas quando variaram mais de 5%. Os extrativos não nitrogenados (ENN) foram calculados pela diferença entre a MS e a soma da PB, EEHA, FB e MM. Todas as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP. Baseado nos resultados obtidos no laboratório, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo em hidrólise ácida, fibra bruta e extrativos não nitrogenados das rações. Estes cálculos foram realizados com a seguinte fórmula: $CDAN (\%) = \frac{[\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)}]}{[\text{nutriente ingerido (g)}]} \times 100$ (Pond et al. 1995).

O escore fecal foi avaliado ao longo do período de coleta de fezes para a digestibilidade, às quais foram atribuídas notas de 0 a 5, sendo consideradas: 0 = fezes líquidas; 1= fezes pastosas e sem forma; 2= fezes macias, mal formadas e que assumiam o formato do recipiente de colheita; 3= fezes macias, formadas e úmidas, que marcavam o piso; 4= fezes bem formadas e consistentes que não marcavam o piso; 5= fezes bem formadas, duras e secas. Foram considerados como escore fecal ideal, valores entre 3 e 4 (CARCIOFI et al., 2008).

3.6 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada e ácido láctico

As amostras de fezes foram coletadas em até 30 minutos após a defecação. Após coletadas, foram homogeneizadas e pesadas, sendo que para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foram utilizadas 3g das fezes acidificadas com 9mL de ácido fórmico a 16%. Para a determinação do ácido láctico, foram empregados mais 3g das fezes diluídas em 9mL de água destilada. As misturas foram mantidas pelo prazo de sete dias em refrigerador, homogeneizadas diariamente, e posteriormente, centrifugadas por 15 minutos à 15°C em 5.000rpm. O sobrenadante foi reservado e o sedimento desprezado, sendo este procedimento repetido por três vezes. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C). A determinação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foi realizada por cromatografia gasosa (Shimadzu, 2014) de acordo com ERWIN et

al. (1961), com detector de ionização de chama, controlado pelo programa Shimadzu GC Solution e coluna de separação Stalbilwax de 30 metros e 0,53mm, gás hélio como carreador, nitrogênio como make up, oxigênio com regulagem manual e injetor e detector de chama à 250°C, e a temperatura da coluna mantida em 145°C. Para calibração foi utilizada solução de padrão externa com ácido acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico e isobutírico.

As amostras líquidas, previamente centrifugadas, foram injetadas e vaporizadas percorrendo, com auxílio do gás de arraste a coluna. Nesta coluna os ácidos vaporizados mais leves percorrem mais rapidamente a coluna, atingindo o detector de ionização de chama. Neste, a corrente formada pela ionização da chama com o ácido é coletada e enviada a um computador na forma de impulso elétrico. Este calcula a concentração da amostra e compara as áreas dos picos formados pela intensidade dessa corrente com a área dos picos formados pela solução contendo o ácido padrão. Desta forma, calculou-se a concentração da amostra através de uma regra de três simples.

O ácido láctico foi mensurado segundo metodologia descrita por PRYCE (1969), pelo método de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro (QUICK-Lab, DRAKE Eletrônica Comércio LTDA, São José do Rio Preto – SP). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

3.7 Determinação do pH fecal

A coleta das fezes para determinação do pH fecal foi realizada em até 30 minutos após a defecação dos animais. Sua determinação foi realizada em um peagâmetro digital de bancada (Digimed, DM-20, São Paulo/SP). No momento da avaliação, realizou-se a introdução direta do eletrodo em uma solução de 9:1 de água destilada e fezes, sendo pesados 2g de fezes, as quais foram diluídas em 18mL de água destilada, e posteriormente mensurado o pH da solução, conforme metodologia adaptada de WALTER et al. (2005).

3.8 Determinação de aminas biogênicas

Para realizar as análises do perfil de aminas biogênicas nas fezes dos animais, foram coletadas 5g de fezes frescas em duplicata, em até 30 minutos após a defecação, as quais foram

conservadas em 7mL de ácido tricloroacético a 5% e refrigeradas. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 20 minutos à 4°C, o sobrenadante filtrado em papel filtro qualitativo e o resíduo extraído por mais duas vezes, empregando-se 7mL e 6mL de ácido tricloroacético a 5%. Os sobrenadantes foram combinados para posterior determinação das aminas biogênicas. Estas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas por fluorimetria após derivação pós-coluna com oftalaldeído (VALE e GLÓRIA, 1997).

A identificação das aminas foi realizada por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. Os padrões de aminas empregados foram: dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, dicloridrato de histamina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina), complexo sulfato creatinina agmatina, tricloridrato de espermidina, tetracloridrato de espermina, cloridrato de 2-feniletilamina e triptamina. A solução estoque foi preparada por diluição do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1N, formando soluções padrão contendo 1mg/mL de cada amina. Em seguida, cada solução padrão foi transferida para um balão volumétrico, formando solução com 10 aminas, conforme metodologia descrita por FIGUEIREDO (2008). Todos os procedimentos para a determinação das aminas foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG.

3.9 Determinação de nitrogênio amoniacal nas fezes

Para determinação do nitrogênio amoniacal fecal, 3g de fezes frescas (coletadas no máximo 30 minutos após a defecação) foram homogeneizadas e misturadas com 9mL de ácido fórmico a 16%. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 5.000rpm durante 15 minutos a 15°C por três vezes, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C). Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e em seguida alíquotas de 2mL diluídas em 13mL de água destilada e submetidas à destilação em nitrogênio. A destilação foi realizada com 5mL de solução 0,2N de hidróxido de potássio, e a titulação com ácido clorídrico 0,005N, conforme VIEIRA (1980). Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

3.10 Avaliação de compostos orgânicos voláteis nas fezes

Foram coletadas fezes frescas dos animais em até 30 minutos após a defecação, as quais foram rapidamente homogeneizadas, posteriormente colocou-se 0,5g de amostra dentro de um frasco de vidro de 20mL hermeticamente fechado com tampa metálica vazada e septo de dupla face de silicone/teflon. As amostras foram armazenadas e mantidas a -20°C até o envio para o laboratório. No laboratório os frascos foram aquecidos, incubados a 80°C por um período de 20 min com agitação de 250rpm. Após esse período tomou-se uma alíquota de 500µL, com uma seringa gas-tight de 2,5mL, aquecida a 100°C e imediatamente injetou-se na porta de injeção (PIRES; AUGUSTO, 2000; SILVA, 2007).

As amostras foram submetidas à análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MSD, Agilent Technologies, California, EUA) utilizando o equipamento constituído de um cromatografo de gás Agilent 7890A (GC) e um detector seletivo de massas Agilent 5975C (MSD) equipado com um injetor automático, liner split/splitless, MPS2 twister (Gerstel. Ing, Maryland, EUA) no modo de injeção SPME-HS com um fluxo constante de 1,0mL/min-1. O GC foi equipado com uma coluna capilar Agilent J&W HP-5ms UI de fase estacionária (CarborWax 19091S-433UI) (Agilent technologies, California, EUA) 30m x 0,25mm de diâmetro interior, espessura do filme 0,25µm. Injeção sem divisão foi levada a cabo à temperatura de entrada de 250°C. A separação dos componentes voláteis das amostras foi lograda com o seguinte programa de temperaturas do forno: a temperatura inicial da coluna foi de 40°C e se manteve durante 2 min; foi aquecido a 280°C a uma velocidade de 10°C/min-1 durante 5 min. O MSD foi equipado com analisador mono-quadrupolo com temperatura de 150°C e temperatura da fonte de íons de 230°C, modo de aquisição scan na faixa de 10 a 400 daltons e corte de solvente a 0,5 min.

Para a identificação dos compostos detectados, foi empregada a biblioteca de espectros de massas da NIST de 2008, selecionando-se o índice de similaridade ≥ 75 . Nos casos em que o índice de similaridade foi inferior, procedeu-se a interpretação dos espectros de massas. As análises foram realizadas no Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP).

3.11 Determinação da concentração fecal de bactérias pela tecnologia de sequenciamento Illumina

Foi extraído o DNA total a partir de amostras fecais frescas com o kit Mobio PowerSoil [MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA (McInnes e Cutting, 2010)]. A concentração de DNA extraído foi quantificada em Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies, Grand Island, NY). Amplificações do gene 16S rRNA foram geradas a partir de uma matriz Fluidigm Access (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA) em combinação com a Roche High Fidelity Fast Kit Start (Roche, Indianapolis, IN). Os primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') alvo 291 bp-fragmento da região V4 foram usados para amplificação (primers sintetizados por IDT Corp., Coralville, IA) (CAPORASO et al., 2012b). Fluidigm iniciador específico para frente (CS1 tag) e inverso (CS2 tag) foi adicionado de acordo com o protocolo Fluidigm. O analisador de fragmento (Advanced Analytics, Ames, IA) foi usado para confirmar a qualidade das regiões e tamanhos dos amplicons. Um pool de DNA foi gerado por combinação de quantidades equimolares dos fragmentos amplificados a partir de cada amostra. As amostras reunidas foram selecionadas por tamanho em gel de 2% agarose E-gel (Life Technologies, Grand Island, NY) e extraído através do emprego do kit de purificação em gel de Qiagen (Qiagen, Valência, CA). Produtos agrupados selecionados por tamanho e limpos foram executados em um Agilent Bioanalyzer para confirmar perfil adequado e tamanho médio. O sequenciamento Illumina foi realizado num MiSeq utilizando reagentes V3 (Illumina Inc., San Diego, CA) no W.M. Keck - Centro de Biotecnologia da Universidade de Illinois. Tags Fluidigm foram removidos usando-se FASTX-Toolkit (versão 0.0.13), e QIIME 1.8.1 foi utilizado para processar os dados de sequências resultantes (CAPORASO et al., 2010a). A sequência de dados de alta qualidade (valor de qualidade >25) derivado a partir do processo de sequenciação foram desmultiplexados. As sequências foram então agrupadas em unidades operacionais taxonômicas (OTU) utilizando referência-aberta OTU contra o banco de dados de referência OTU Greengenes 13_8 com um limite de similaridade de 97% (DeSantis et al., 2006). Singleton (UTOs que foram observados menos de 2 vezes) e UTOs que tinham menos do que 0,01% do total de observação foram descartadas.

3.12 Teste de fagocitose e burst oxidativo

Para a realização deste ensaio, leucócitos sanguíneos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) foram incubados com um reagente fluorescente que indicou a produção de espécies reativas de oxigênio no estado basal e após realizarem fagocitose de bactérias *S. Aureus* que indicou a porcentagem e intensidade de fagocitose. As células foram incubadas com o reagente DCFH-DA em PBS (tampão fosfato salina) e com DCFH e a *S. aureus* marcada com um fluorocromo (iodeto de propídeo), sendo mantidas a 37°C por 20 minutos. Após este período, as hemácias foram rompidas com uma solução de lise e procedeu-se as lavagens com PBS até a obtenção de uma amostra de aspecto límpido, que foi submetida à leitura em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (Becton & Dickinson).

3.13 Teste de linfoproliferação

O ensaio foi conduzido em placas para microtitulação de 96 poços e fundo em “U”. Os linfócitos sanguíneos foram obtidos pela separação em partículas de ferro e após purificação e lavagens em meio RPMI-1640 foram adicionados aos poços em concentração equivalente a 1×10^5 células/em 200µL/poço. Os mitógenos utilizados foram a concanavalina A e a fitohemaglutinina. As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Decorridas 72 horas de incubação, as células foram coletadas e a avaliação da proliferação, realizada em citômetro de fluxo modelo FACS Calibur (Becton & Dickinson). Para análise dos dados de fluorescência, foram considerados os valores da porcentagem de divisões celulares e o índice de proliferação celular. Para a obtenção e análise dos resultados foram utilizados os softwares *CellQuest* e *FlowJo* (TreeStar), respectivamente.

3.14 Imunofenotipagem de linfócitos

Foram avaliados o número de linfócitos T auxiliares (CD3/CD4+/CD45R-) e linfócitos T citotóxicos (CD3/CD8+/CD45R-) naives, linfócitos TCD45+ (linfócitos de memória), de linfócitos B (CD21+) e a relação CD4/CD8. As células mononucleares (2×10^5 células/mL) foram incubadas em microtubos (1,5mL) com o anticorpo CD3 (1:100), CD4 (1:10), CD8 (1:20), CD21 (1:100) e CD45R (1:100) (Anticorpo da Serotec, Biolegend e eBioscience), diluído em 100µL de tampão para citometria (PBS contendo 0,5% de soroalbumina bovina e

0,02% de azida sódica). Foram incluídos no ensaio os anticorpos isotípicos para definição da região negativa (background). As células foram incubadas por 20 minutos a 4°C, protegidas da luz. Com o término do período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão para citometria em um volume de 1000µL/microtubo. Por fim, as células foram ressuspensas em 500µL de tampão fosfato. Foi selecionada como população de linfócitos a população de células com baixo tamanho (FSC) e baixa complexidade (SSC) de acordo com o gate delimitado. A partir dessa seleção foram determinadas as distintas populações de linfócitos. A aquisição e a análise de 10.000 células foram feitas pela técnica de citometria de fluxo. Todos os testes imunológicos (Teste de fagocitose e burst oxidativo, teste de linfoproliferação e imunofenotipagem de linfócitos) foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

3.15 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004), sendo previamente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo teste F. As variáveis que não atenderam as premissas estatísticas sofreram transformação logarítmica ou raiz quadrada e então foi realizada análise de variância pelo PROC GLM do SAS com as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, bem como através de regressão polinomial simples, considerando 2 graus de liberdade (linear e desvio). Dados que após as transformações e/ou retirada de *outliers* não apresentaram normalidade e/ou homogeneidade foram então analisados por estatística não paramétrica pelo PROC NPAR1WAY do SAS.

As abundâncias observadas para cada filo e para cada gênero de cada animal foram avaliadas por meio de Modelo Linear Generalizado, considerando distribuição binomial e utilizando a função de ligação *logit*. O modelo incluiu o efeito fixo de tratamentos (níveis de levedura: 0,0; 0,3 ou 0,6), além do efeito aleatório do resíduo. Para as comparações múltiplas, adotou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância e 10% como tendência. Todas as análises foram realizadas utilizando o procedimento PROC GENMOD, do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos da inclusão de levedura com metabólitos ativos na digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, microbiota, produtos da fermentação fecal e variáveis imunológicas de cães adultos saudáveis. Para sua execução, foram estudados aspectos pouco explorados na literatura até então, como a avaliação da microbiota intestinal pelo emprego de tecnologia de última geração Illumina e a composição dos compostos orgânicos voláteis presente nas fezes de cães adultos saudáveis. No quadro 1 estão apresentados os principais resultados de pesquisa com prebióticos para cães e gatos publicados até o momento.

Quadro 1. Estudos publicados que avaliaram o uso de prebióticos na digestibilidade dos nutrientes, produtos da fermentação fecal, microbiota e imunidade em cães e gatos

Autores	Espécie	Fontes	Principais resultados
Sparkers et al. (1998)	Gatos	FOS	Aumento em <i>Lactobacillus spp.</i> e <i>Bacteroides spp.</i> , seguido de redução em <i>E. coli</i> e tendência em <i>C. perfringens</i> .
Strickling et al. (2000)	Cães	XOS, FOS e PCL	PCL: tendência à redução em ácido butírico ileal e em <i>Clostridium perfringens</i> fecal, seguido de aumento em ácido propiônico ileal em comparação às demais fontes (FOS e XOS). O grupo controle apresentou maior concentração ileal de ácido butírico em comparação ao FOS, MOS e XOS.
Hesta et al. (2001)	Gatos	Oligofrutose e inulina	Ambos aditivos reduziram a digestibilidade aparente da proteína bruta e gordura. Inulina: aumento na concentração fecal de AGCC.
Swanson et al. (2002a)	Cães	FOS, PCL e FOS + PCL	PCL: redução em aeróbios totais e tendência a redução na digestibilidade ileal. Tendência a aumento em <i>Lactobacillus spp.</i> FOS + PCL: tendência à redução em anaeróbios totais.
Swanson et al. (2002b)	Cães	FOS+MOS	FOS +MOS: resultou em aumento das concentrações de <i>bifidobacteria</i> fecal, <i>lactobacilli</i> fecal e ileal, alta concentração de linfócitos sanguíneos e baixa de neutrófilos.
Swanson et al. (2002c)	Cães	FOS, MOS, FOS+MOS	MOS: tendência na redução da concentração de aeróbios totais. FOS+MOS: tendência em baixa concentração de anaeróbios totais.
Zentek et al. (2002)	Cães	PCL, TGOS, Lactose e Lactulose	PCL: redução na digestibilidade dos nutrientes e na excreção fecal de amônia.
Flickinger et al. (2003)	Cães	Frutanos (Inulina e FOS) e FOS	Frutanos: redução na digestibilidade aparente dos nutrientes, tendência à redução na concentração fecal de amônia e tendência em aumento na concentração de AGCC. FOS: tendência em aumento na digestibilidade ileal e redução linear na concentração de <i>C. perfringens</i> .
Propst et al. (2003)	Cães	Inulina e Oligofrutose	Oligofrutose: aumento linear em aminas biogênicas. Inulina e oligofrutose: redução nos coeficientes de digestibilidade aparente. Aumento em amônia e em determinados ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.
Grieshop et al. (2004)	Cães	Chicória, PCL e Chicória + PCL	PCL: redução na concentração fecal de <i>E. coli</i> , aumento em <i>Bifidobacterium spp.</i> Chicória: aumento de <i>Bifidobacterium spp.</i> e tendência em aumento da digestibilidade da gordura.
Apanavicius et al. (2007)	Cães	FOS e Inulina	Inulina: aumento em AGCC e <i>Lactobacillus spp.</i> fecal.
Middelbos et al. (2007a)	Cães	Polpa de beterraba, celulose e blends (celulose + FOS + PCL)	Celulose: redução na digestibilidade aparente em comparação ao controle. Polpa de beterraba: aumento em <i>Bifidobacterium spp.</i> e determinados AGCC em comparação ao grupo controle. Blends: redução da digestibilidade aparente e aumento em determinados AGCC.

Autores	Espécie	Fontes	Principais resultados
Middelbos et al. (2007b)	Cães	PCL	Comportamento cúbico na digestibilidade aparente dos nutrientes e redução linear e tendência a comportamento cúbico para <i>E. coli</i> , pelas técnicas de plaqueamento e PCR em tempo real, respectivamente. Tendência a comportamento cúbico para <i>C. perfringens</i> e <i>Lactobacillus spp.</i>
Barry et al. (2009)	Cães	FOS e inulina	Inulina: aumento linear na digestibilidade ileal e aparente, comportamento quadrático para os AGCC. FOS: aumento linear na digestibilidade ileal e comportamento quadrático para digestibilidade aparente, bem como significância ou tendência quadrática em determinados ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.
Gomes (2009)	Cães	PCL	Tendência ao aumento em ácido butírico e comportamento variável em aminos biogênicos.
Aquino (2009)	Gatos	PCL	Aumento linear na digestibilidade aparente da matéria seca.
Barry et al. (2010)	Gatos	Celulose, FOS e pectina	As fibras fermentáveis apresentaram elevação na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, amônia, aminos biogênicos, <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> e redução na digestibilidade aparente da proteína bruta e gordura, com comportamento variável dependendo da fonte de fibra quando comparadas à celulose.
Félix et al. (2010)	Cães	PCL	Redução da amônia fecal.
Faber et al. (2011)	Cães	GGMO	Aumento linear na digestibilidade aparente da matéria seca e concentração fecal de ácido acético, propiônico e AGCC total. Redução na digestibilidade aparente da proteína bruta e ácido butírico. Modulação em <i>Bifidobacterium spp.</i>
Kanakupt et al. (2011)	Gatos	FOS, GOS, FOS+GOS	FOS + GOS: aumento em ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e redução na digestibilidade aparente da proteína bruta. FOS, GOS e FOS + GOS: aumento na contagem fecal de <i>Bifidobacterium spp.</i>
Beloshapka, Wolff e Swanson (2012)	Cães	Polidextrose	Tendência à redução na digestibilidade aparente da proteína bruta. Redução em <i>C. perfringens</i> e aumento em AGCC.
Fischer et al. (2012)	Gatos	Polpa de beterraba, fibra de cana de açúcar e farelo de trigo	Todas as fontes reduziram a digestibilidade aparente dos nutrientes. Farelo de trigo: aumento em ácido propiônico. Polpa de beterraba: aumento em AGCC e ácido láctico.
Aquino et al. (2012)	Gatos	PCL	Nenhum efeito na concentração de AGCC, amônia, contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>E. coli</i> e ácido láctico.
Barry et al. (2014)	Gatos	Celulose, FOS, pectina	Pectina: reduziu a digestibilidade da fibra e gordura e aumentou <i>Clostridium perfringens</i> , <i>E. coli</i> e <i>Lactobacillus spp.</i> Pectina e FOS: aumentou escore fecal, AGCC e aminos biogênicos. FOS: aumentou <i>Bifidobacterium spp.</i> e reduziu <i>Escherichia coli</i> .

Santos (2015)	Gatos	PCL	Aumento linear de <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , ácido butírico e aminas biogênicas. Redução linear em <i>Clostridium perfringens</i> e quadrática no grupo <i>E. coli</i> - <i>Hafnia alvei</i> - <i>Shigella spp.</i>
Matheus (2016)	Gatos	Leveduras com metabólitos ativos	Redução da concentração de ácido láctico, <i>Clostridium perfringens</i> e ácido isovalérico.
Stercova et al. (2016)	Cães	LY (levedura viva)	Baixa concentração de <i>Escherichia coli</i> e enterococci fecal.
Pawar et al. (2017)	Cães	MOS	A porcentagem de subpopulações de linfócitos CD4+ e a proporção de CD4+:CD8+ foram maiores no grupo MOS.
Garcia-Mazcorro et al. (2017)	Cães e gatos	FOS+Inulina	Dose baixa: menor abundância de <i>Gammaproteobacteria</i> e maior abundância de <i>Veillonellaceae</i> em gatos, enquanto <i>Staphylococcaceae</i> apresentou maior abundância em cães. Dose alta: menor abundância de <i>Dorea</i> (família Clostridiaceae) e maior abundância de <i>Megamonas</i> e outros membros (desconhecidos) de <i>Veillonellaceae</i> em cães

AGCC: ácido graxo de cadeia curta; PCL: parede celular de levedura; FOS: fruto-oligossacarídeos; GOS: gluco-oligossacarídeos; MOS: mananoligossacarídeos; XOS: xilo-oligossacarídeos; GGMO: galacto glucônico manano oligossacarídeos

4.1 Digestibilidade aparente dos nutrientes, ingestão de alimento e variáveis fecais

Todos os animais apresentaram ingestão adequada do alimento, não apresentaram casos de rejeição ou diarreia. Na Tabela 3 estão apresentados os dados de consumo de alimento em base de matéria seca, produção fecal, escore fecal e coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes que foram avaliados durante o período experimental.

Tabela 3. Ingestão de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia metabolizável das dietas experimentais

Item	Dietas ¹			EPM ²	Valor de <i>p</i>
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6		
Consumo (g/dia)					
Matéria natural	197,33	170,67	198,00	15,07	0,75
Matéria seca	187,95	156,28	180,54	14,46	0,69
Matéria orgânica	184,21	160,56	185,94	14,54	0,76
Proteína bruta	70,37	53,34	66,08	5,37	0,45
Extrato etéreo em hidrólise ácida	30,83	27,95	28,44	2,38	0,89
Fibra bruta	13,25	12,55	13,05	1,05	0,97
Matéria mineral	13,12	10,11	12,06	0,99	0,50
Extrativos não nitrogenados	69,76	66,72	78,37	5,91	0,74
Energia bruta (Kcal/dia)	1031,29	891,74	1018,82	80,56	0,77
Coeficientes de digestibilidade (%)					
Matéria seca	85,84	85,09	85,43	0,72	0,76
Matéria orgânica	89,10	88,44	88,35	0,58	0,62
Matéria mineral	40,08	31,82	40,41	3,13	0,12
Proteína bruta	90,56 ^a	86,90 ^c	88,62 ^b	0,74	0,01
Fibra bruta	60,95 ^b	74,41 ^a	72,13 ^a	2,03	<0,001
Extrato etéreo em hidrólise ácida	94,44	95,78	95,72	0,79	0,42
Extrativos não nitrogenados	91,02 ^a	89,24 ^b	88,15 ^b	0,72	0,04
Energia bruta	89,69	88,78	88,60	0,56	0,36
Energia metabolizável (Kcal/kg)	4100 ^a	4003 ^b	3902 ^c	33,38	<0,01
Produção fecal					
Escore fecal	3,97	3,88	3,97	0,05	0,42
g fezes MN/cão/dia	85,34	73,54	88,54	14,46	0,75
g fezes MS/cão/dia	26,16	23,11	26,37	3,86	0,80

¹DC (dieta controle); LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos); ²EPM, erro padrão da média; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Pelos dados apresentados na tabela 3, pode-se verificar que não houve diferença no consumo médio diário da MS, MN, MO, PB, EEHA, FB, MM e energia bruta (p>0,05). A produção fecal na matéria natural, matéria seca e escore fecal também não apresentaram diferença (p>0,05). Estes achados corroboram os estudos de Strickling et al. (2000), Swanson et al. (2002a) e Zentek et al. (2002), que não encontraram alteração na produção fecal. Gomes

(2009) encontrou aumento linear na produção fecal de cães suplementados com PCL e Middelbos et al. (2007a) observaram comportamento quadrático. A fonte e a concentração de prebiótico, assim como a matriz nutricional da dieta, são fatores importantes para a atuação dos prebióticos sobre a produção fecal. A digestibilidade dos nutrientes e a fermentação dos aditivos estão relacionados com a produção de AGCC, que podem modular a absorção de água por efeito osmótico. Este seria um efeito dose dependente, pois altas concentrações podem contribuir para o aumento do teor de água nas fezes (NRC, 2006) e por consequência, alterar o escore fecal. A avaliação da qualidade das fezes é utilizada pelos tutores de animais de companhia para auxiliar na decisão de escolha do alimento comercial. Mesmo apresentando alta variabilidade e subjetividade, o escore fecal é uma medida importante em pesquisas com prebióticos (Santos, 2015). Efeitos positivos da PCL sobre o escore fecal foram relatados por Félix et al. (2010) em cães. Gomes (2009) por sua vez encontrou tendência a comportamento quadrático, sendo encontrada piora nos tratamentos intermediários (0,15% e 0,30% de PCL) frente aos extremos (0% e 0,45% de PCL).

A inclusão do prebiótico não influenciou os CDAs da MS, MO, MM, EEHA e EB ($p>0,05$). Estes achados concordam com os achados de Strickling et al. (2000) para MS, ao adicionarem 5g de MOS por kg de dieta para cães e por Swanson et al. (2002a), que também não observaram alteração nos CDA em trato digestório total dos nutrientes em cães suplementados com MOS. Zentek et al. (2002) observaram diminuição no CDA da MS, PB, ENN e em cães suplementados com 1g de MOS por Kg de peso corporal por dia, durante 10 dias. O contrário ocorreu, neste estudo, com os ENN que apresentaram maior digestibilidade no tratamento controle ($p=0,04$). Para a FB observou-se digestibilidade superior nos tratamentos com levedura em relação ao grupo controle ($p<0,001$). Esses resultados foram similares ao coeficiente de digestibilidade aparente da fibra bruta encontrados por Gomes (2009) que observou efeito quadrático, com a inclusão de 0,15% de PCL. Middelbos et al. (2007b) demonstraram efeito cúbico na digestibilidade da fibra insolúvel, com maior coeficiente encontrado na inclusão de 0,25% de PCL. A metodologia utilizada para determinação da fibra bruta não é inteiramente satisfatória, por se tratar de uma técnica deficiente (CECCHI, 2003). A principal limitação está relacionada ao fato de não separar a celulose da hemicelulose e causar a perda da lignina (que não é considerada carboidrato) e da hemicelulose. Este método fornece valores que podem mudar devido ao uso de digestão muito drástica, o que leva à perda de alguns componentes e, portanto, os valores e as diferenças obtidas em nosso estudo podem não serem substancialmente afirmados.

A maior digestibilidade da PB foi observada no tratamento controle e a menor com a maior dosagem de levedura ($p=0,01$). O achado do presente trabalho corrobora os de Middelbos et al. (2007a) que citaram que o aumento da biomassa microbiana intestinal pode repercutir em redução da digestibilidade aparente da proteína com a inclusão de prebiótico. Swanson et al. (2002a) observaram que o mananoligossacarídeo presente na PCL pode se ligar a proteína da dieta e assim, reduzir sua digestibilidade. Já em relação à energia metabolizável, o tratamento controle foi superior ao LMA 0,3 e LMA 0,6. Assim como citado por Gomes (2009), as diferenças encontradas no teor de energia metabolizável dos alimentos, em kcal/kg, são na verdade reflexo das pequenas variações na energia bruta das dietas. Pois as dietas apresentaram os mesmos coeficientes de digestibilidade da energia bruta.

4.2 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada, nitrogênio amoniacal, ácido láctico e aminas biogênicas

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de pH fecal e concentração de ácido láctico, amônia, ácidos graxos de cadeia curta, ramificada e aminas biogênicas. Nenhum dos produtos da fermentação intestinal apresentou diferenças entre as dietas, neste estudo. Gomes (2009) verificou que com a inclusão de PCL ocorreu aumento linear no pH das fezes dos cães, fato também observado no estudo de Swanson et al. (2002a), sem aumento na concentração de lactato nas fezes, mas foi justificado pela rápida absorção de AGCC no cólon. Stercova et al. (2016) não observou alterações no pH e na concentração de ácido láctico em beagles suplementados com leveduras vivas. No estudo de Matheus (2016), o ácido láctico apresentou concentração superior nas fezes dos gatos dos grupos que receberam levedura em comparação ao controle. Quanto aos AGCC, o presente estudo corrobora os resultados encontrados por Swanson et al. (2002a) e Zentek et al. (2002) ao avaliarem a suplementação de cães com um grama de MOS por quilograma de peso corporal ao dia, sem diferença. Em gatos, Santos (2015) observou tendência de aumento linear com a inclusão de PCL na dieta.

Tabela 4. Concentração de ácido láctico, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, aminos biogênica e pH das fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais

Item	Dietas ¹			EPM ²	Valor de <i>p</i>
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6		
pH fecal	6,66	6,56	6,44	0,10	0,34
Ácido láctico, mMol/Kg de MS	13,22	16,30	11,69	3,56	0,62
Amônia, mMol/Kg de MS	130,53	150,72	165,67	24,33	0,60
Ácidos graxos de cadeia curta, mMol/Kg de MS					
Ácido acético	55,02	86,47	84,17	10,00	0,07
Ácido propiônico	25,77	42,98	40,80	4,94	0,05
Ácido butírico	9,41	12,04	13,00	2,16	0,49
AGCC totais	90,21	141,5	137,98	10,05	0,07
Ácidos graxos de cadeia ramificada, mMol/Kg de MS					
Ácido valérico	-	-	-	-	-
Ácido iso-valérico	2,20	2,58	3,40	0,59	0,36
Ácido iso-butírico	1,95	2,00	2,55	0,39	0,50
AGCR totais	4,16	4,58	5,96	0,55	0,42
Ácidos graxos totais	94,36	146,08	143,94	16,46	0,07
Aminas biogênicas, mg/Kg de fezes na MN					
Tiramina	80,38	12,47	65,91	43,88	0,53
Putrescina	130,54	92,14	106,35	26,33	0,59
Cadaverina	54,42	18,31	37,29	24,57	0,56
Espermidina	41,22	34,80	41,25	5,67	0,65
Feniletilamina	-	4,25	3,04	-	-
Triptamina	1,81	3,18	2,44	-	-
Aminas totais	271,32	155,35	223,95	41,25	0,56

¹DC (dieta controle), LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos); ²EPM, erro padrão da média; n = 6 cães por dieta; MS= matéria seca; MN= matéria natural; AGCC= ácidos graxos de cadeia curta; AGCR= ácidos graxos de cadeia ramificada; ^{a,b,c}Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Carboidratos fermentáveis fornecem à microbiota intestinal fonte extra de energia, que pode auxiliar na redução da concentração de compostos putrefativos. Com essa fonte de energia provinda dos carboidratos, a proteína não digerida e seus metabolitos são utilizados pelas bactérias para síntese proteica, diminuindo a concentração de compostos da fermentação de proteína nas fezes (CUMMINGS et al., 1979). Estes são considerados os principais responsáveis pelo mau odor das fezes, incluindo a amônia, aminos biogênicas, ácidos graxos de cadeia ramificada, indóis, fenóis e compostos sulfurados voláteis (SWANSON et al., 2002a). Zentek et al. (2002), observaram diminuição da excreção fecal de amônia em cães suplementados com MOS. Porém, a concentração fecal de amônia não foi afetada com a inclusão de leveduras na dieta para gatos no estudo de Matheus (2016). Assim como em cães suplementados com leveduras vivas no estudo de Stercova et al. (2016).

O presente estudo corrobora com os resultados de Swanson et al. (2002a) e Matheus (2016), que não observaram diferença entre as aminos biogênicas analisadas. Em contrapartida, Gomes (2009) verificou redução da tiramina, histamina, feniletilamina e triptamina nas fezes dos cães com a adição de PCL à dieta. Santos (2015) verificou aumento linear da putrescina, cadaverina, histamina e aminos biogênicas totais com a inclusão de PCL na dieta de gatos. Propst et al. (2003) encontraram tendência ao aumento na concentração de putrescina, cadaverina, espermidina e aminos biogênicas totais em cães suplementados com oligofrutose, bem como Middelbos et al. (2007b) que observaram aumento de putrescina em cães que receberam *blends* de prebióticos com PCL.

4.3 Determinação de compostos orgânicos voláteis nas fezes

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) segundo o Conselho Nacional de Pesquisa (NRC, 2002) são definidos como substâncias que se vaporizam facilmente em temperatura ambiente e que apresentam pelo menos um átomo de carbono e um hidrogênio em sua estrutura. Os compostos voláteis podem refletir as diferenças da dieta, da microbiota intestinal e da exposição à contaminantes químicos, pois normalmente são gerados pelo metabolismo dos microrganismos intestinais como produtos finais dos componentes ingeridos pelo animal (GARNER et al., 2007).

Na Tabela 5 estão apresentadas as médias dos compostos orgânicos voláteis (COVs) detectados nas fezes e sua porcentagem de ocorrência em cada um dos tratamentos. Os compostos identificados com maior frequência durante o experimento foram selecionados com o objetivo de verificar a existência de diferenças entre os tratamentos. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 5. Porcentagem de ocorrência dos compostos orgânicos voláteis (COVs) nas fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais

Item	Dietas		
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6
Acetona	16,7	50,0	33,3
Etanol ^a	50,0	83,3	66,7
1-propanol	16,7	83,3	66,7
Ácido butanóico ^a	83,3	83,3	33,3
Ácido acético ^a	83,3	100	66,7
Ácido propanóico ^a	50,0	66,7	33,3
Ácido propanóico, 2-metil-	-	33,3	16,7
Álcool feniletil	-	-	16,7
Quinolina	-	16,7	16,7
Fenol ^a	50,0	83,3	66,7
2-piperidinona ^a	50,0	83,3	33,3
Indol ^a	66,7	100	66,7
3-terc-butil-hidroxianisol	16,7	33,3	16,7
Colesterol	33,3	-	-
Oxime-, metoxi-fenil	16,7	50,0	16,7
Acetoína	16,7	16,7	-

¹DC (dieta controle), LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos); n = 6 cães por dieta; ^a Compostos selecionados para análise discriminante.

No total, foram identificados 16 COVs nas fezes dos animais incluídos neste estudo. Sete compostos apresentaram maior frequência (Tabela 6). Nenhum dos COVs apresentou diferença entre as dietas. Entre os compostos observados, os mais comuns foram o ácido acético, ácido butanóico, ácido propanóico, fenol, indol, etanol e 2-piperidinona. Apesar de não terem sido observadas alterações significativas no pH fecal, segundo Hwang et al. (2016) os fenóis são produzidos em presença de pH fecal baixo e os indóis em pH fecal alto. De acordo com Garner et al. (2007) e Costello & Ratcliffe (2013), a identificação de etanol está relacionada com a presença de levedura nas dietas. Os ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, butírico e propanóico) e indol, apresentaram de forma geral os picos mais altos em todas as amostras, representando maior abundância quando comparado com os demais compostos. Estes por sua vez, são em sua maioria resultantes da fermentação dos carboidratos (MACKIE et al., 1998; CHO et al., 2015; HWANG et al., 2016).

Tabela 6. Média percentual da área dos picos dos compostos orgânicos voláteis mais abundantes presentes nas fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais

Ítem	Dietas ¹			EPM ²	Valor de p
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6		
Ácido acético	12,88	13,78	12,56	3,19	0,95
Ácido butanóico	4,52	6,26	8,33	1,47	0,28
Etanol	1,49	3,66	7,08	1,48	0,08
Indol	6,80	14,10	7,82	2,45	0,09
Fenol	1,59	4,18	4,26	1,10	0,24
Ácido propanóico	11,73	15,01	14,76	2,29	0,54
2_piperidinona	2,35	2,87	1,86	0,53	0,43

¹DC (dieta controle), LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos); ²EPM, erro padrão da média; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Hesta et al. (2011) identificaram a presença de componentes sulfurados (butil metil sulfureto, metil propil disulfureto e dimetil trisulfureto) em quase todos os tratamentos com inclusão de prebióticos em fezes de cães. Porém, no presente estudo não foi observado nenhum desses compostos. Lowe et al. (1997b) encontraram o dimetil trisulfureto em uma única amostra de fezes de cão com adição do extrato de *Yucca schidigera*. Fato similar ao estudo de Urrego (2017), que detectou dimetil trisulfureto e dimetil disulfureto em apenas duas amostras de fezes de cães alimentados com diferentes fontes proteicas.

4.4 Determinação da concentração fecal de bactérias pela tecnologia de sequenciamento Illumina

Utilizou-se uma profundidade de amostragem uniforme de sequências por amostra para avaliar as medidas de diversidade alfa e beta. Obteve-se um total de 917.433 leituras, com média de 50.436 leituras (intervalo = 17.666-93.602) por amostra. As curvas de rarefação foram baseadas em espécies observadas, Chao1 e medidas da distância filogenética de árvores inteiras. Todas curvas atingiram o platô, sugerindo suficiente profundidade de sequenciamento (Figura 2). O conjunto de dados foi reduzido para 16.300 leituras para análise de diversidade e riqueza de espécies. Não houve efeito de tratamento na diversidade alpha (p>0,05).

A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada utilizando-se as distâncias métricas únicas (UniFrac) ponderadas (Figura 3) e não ponderadas (Figura 4), as quais medem

a distância filogenética entre conjuntos de taxa em uma árvore filogenética como a fração do comprimento de ramo da árvore, na OTU de 97% da composição e abundância da matriz (LOZUPONE et al., 2005). A não ponderada, observa presença versus ausência de diferentes taxas de comunidades microbianas entre as amostras, enquanto a ponderada observa mudanças proporcionais na comunidade microbiana. No entanto, os gráficos mostraram que a suplementação de levedura em ambos os níveis (LMA 0,3 e LMA 0,6) não apresentou nenhum efeito na microbiota fecal de cães.

Os filos microbianos predominantes no intestino canino e felino são Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria. A Fusobacteria é o filo predominante no microbioma intestinal (intestino ou fezes), embora represente frequentemente 10% ou mais das sequências do gênero que habita o intestino (DENG e SWANSON 2015). Nesse estudo, o filo bacteriano fecal predominante presente em todos os cães incluíram Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobactérias, Actinobactérias e Deferribacteres (Tabela 7). Em conjunto, Firmicutes e Fusobacteria constituíram cerca de 85-88% das sequências bacterianas, com Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria e Deferribacteres contribuindo com 8-12%, 1-3%, 0,1 - 2% e <0,02% das sequências, respectivamente.

Figura 2. Diversidade alpha - curvas de rarefação baseadas nas unidades operacionais observadas (observed OTU), distâncias filogenéticas (PD whole tree) e métricas (Chao1), de acordo com a dieta consumida pelos animais

Eixo X: profundidade da sequência (16.300 leituras/amostra).

DC = dieta controle; LMA 0,3 = dieta suplementada com 0,3% de levedura com metabólitos ativos; LMA 0,6 = dieta controle suplementada com 0,6% de levedura com metabólitos ativos.

Figura 3. Diversidade beta – análise das coordenadas principais (PCoA) da parcela não ponderada da fração única métrica (Unifrac), de acordo com a dieta consumida pelos animais

DC = dieta controle; LMA 0,3 = dieta suplementada com 0,3% de levedura com metabólitos ativos; LMA 0,6 = dieta controle suplementada com 0,6% de levedura com metabólitos ativos.

Figura 4. Diversidade Beta - Análise das coordenadas principais (PCoA) da parcela ponderada da fração única métrica (Unifrac), de acordo com a dieta consumida pelos animais

DC = dieta controle; LMA 0,3 = dieta suplementada com 0,3% de levedura com metabólitos ativos; LMA 0,6 = dieta controle suplementada com 0,6% de levedura com metabólitos ativos.

Middelbos et al. (2010) caracterizaram filogeneticamente o microbioma fecal de cães saudáveis com 454 pirosequenciamentos pela primeira vez. Os filos dominantes foram Fusobacteria (23-40% das leituras), seguidos por Firmicutes (14-28% das leituras), Bacteroidetes (31-34% das leituras), Actinobacteria (0,8-1,4% das leituras) e Proteobactérias (5-7% das leituras). Embora Fusobacteria não tenha sido a maioria neste estudo, está entre os mais dominantes, como no estudo de Beloshapka et al. (2013), Fusobacteria e Firmicutes compuseram cerca de 75-80% das sequências bacterianas, com Bacteroidetes, Proteobactérias e Actinobactérias contribuindo com apenas cerca de 10-15%, 5% e 2-3% das sequências, respectivamente. A abundância de Actinobacteria fecal aumentou ($p < 0,05$) com a maior dose da dieta prebiótica (Tabela 7), semelhante à encontrada por Barry et al. (2012) em gatos alimentados com a dieta FOS ($p < 0,05$) devido ao aumento de *Bifidobacterium*. Porém no presente estudo, ocorreu aumento do gênero *Collinsella* ($p < 0,05$) também pertencente ao filo Actinobacteria. Bacteroidetes apresentou tendência na redução da abundância com adição do prebiótico ($p < 0,10$). A concentração de Firmicutes aumentou, enquanto Fusobacteria reduziu com a inclusão do prebiótico ($p < 0,05$). Provavelmente devido a redução de *Fusobacterium* ($p < 0,05$). Entre os gêneros proeminentes identificados no estudo de Hand et al. (2013), a combinação de *Prevotella* e *Bacteroides* (pertencentes ao filo Bacteroidetes) em abundância tende a ser inversamente relacionada ao filo Fusobacteria em abundância. Esta distribuição pode estar relacionada com a competição pelo mesmo nicho por esses grupos de bactérias. Este tipo de relação pode ser observada em estudos com humanos, onde a contribuição combinada de Firmicutes e Bacteroidetes tem sido mantida constante ao longo do tempo (NAM et al., 2011).

Tabela 7. Filos bacterianos proeminentes (expresso em porcentagem das sequências totais) nas fezes dos cães alimentados com as dietas experimentais

Item	Dietas			Valor de p
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6	
Unassigned bacteria	0,0115±0,0004	0,0097±0,0004	0,0195±0,0006	0,9886
Actinobacteria	0,1599 ^b ±0,0016	0,7027 ^{ab} ±0,0034	1,8690 ^a ±0,0055	0,0048
Bacteroidetes	11,9900 ^a ±0,0133	9,3700 ^{ab} ±0,0119	8,1500 ^b ±0,0112	0,0768
Deferribacteres	0,0056±0,0003	0,0194±0,0006	0,0109±0,0004	0,9754
Firmicutes	60,0500 ^b ±0,0200	70,3800 ^a ±0,0186	70,7600 ^a ±0,0186	<0,0001
Fusobacteria	25,5000 ^a ±0,0178	17,9600 ^b ±0,0157	17,6200 ^b ±0,0156	0,0008
Proteobacteria	2,2800±0,0061	1,5600±0,0051	1,5700±0,0051	0,5709

DC = dieta controle; LMA 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LMA 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos. As médias são seguidas pelo erro padrão; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,10$).

Os gêneros bacterianos fecais predominantes foram *Clostridium* (18-25%), *Fusobacterium* (16-25%) e *Blautia* (7-11%). Panasevich et al. (2014) também observaram *Fusobacterium* (20-32%), *Clostridium* (14-27%), *Blautia* (10-13%) e *Faecalibacterium* (4-16%) como os gêneros predominantes nas fezes de cães. Poucos gêneros foram afetados pela inclusão do tratamento (Tabela 8). A concentração fecal de *Collinsella* aumentou com a maior inclusão do prebiótico ($p<0,05$). *Prevotella*, *Allobaculum* e *Fusobacterium* reduziram com adição do prebiótico. Mudanças na fibra dietética também afetaram populações bacterianas em gatos, incluindo a diminuição das espécies de *Fusobacterium* (BUENO et al., 2000). No presente estudo *Clostridium* aumentou com a adição do prebiótico. Lubbs et al. (2009), por exemplo, relataram que dietas com alta proteína resultaram em aumento de *Clostridium perfringens* e *Fusobacterium* e populações de *Bifidobacterium* diminuíram nas fezes de gatos adultos. *Blautia* apresentou tendência em aumentar com adição do prebiótico ($p<0,10$) e *Lactobacillus* na dosagem intermediária do prebiótico. Estes últimos são tipicamente considerados um grupo benéfico de bactérias. Em cães com diarreia crônica foi encontrada abundância significativamente alta de *Bacteroides*, mas baixa de *Lactobacillus-Enterococcus* quando comparado com cães saudáveis (JIA et al., 2009). No estudo de Suchodolski et al. (2012), foram encontradas baixas concentrações de *Blautia* nas fezes de cães com diarreia aguda hemorrágica e não hemorrágica. Além disso, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Bacteroides* e *Clostridium* parecem estar envolvidos no metabolismo dos ácidos biliares e afetaram a absorção de gordura dietética e vitaminas lipossolúveis (RIDLON et al., 2006; SWANN et al., 2011).

Tabela 8. Gêneros bacterianos proeminentes (expressos em porcentagem das sequências totais) em fezes de cães alimentados com DC = dieta controle; LMA 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LMA 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos

Item	Dietas			Valor de p
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6	
Unassigned bacteria	0,0120±0,0004	0,0100±0,0004	0,0200±0,0006	0,9886
Actinobacteria				
<i>Bifidobacterium</i>	0,0560±0,0010	0,0898±0,0012	0,0159±0,0005	0,8422
<i>Collinsella</i>	0,0501 ^b ±0,009	0,4268 ^b ±0,0027	1,4411 ^a ±0,0049	0,0052
<i>Slackia</i>	0,0539±0,0009	0,1861±0,0018	0,4119±0,0026	0,3835
Bacteroidetes				
<i>Bacteroides</i>	6,9460±0,0104	7,3920±0,0107	6,4650±0,0100	0,8188
<i>Parabacteroides</i>	0,1259±0,0014	0,0697±0,0011	0,0790±0,0011	0,9446
<i>Prevotella</i>	3,0442 ^a ±0,0070	0,5842 ^b ±0,0031	0,5613 ^b ±0,0031	0,0003
S24-7__	0,1021±0,0013	0,0095±0,0004	0,0071±0,0003	0,6529
[Paraprevotellaceae] Other	0,4410±0,0027	0,4186±0,0026	0,2343±0,0020	0,7954
[Paraprevotellaceae] __	0,0455±0,0009	0,0347±0,0008	0,0166±0,0005	0,9581
[Paraprevotellaceae] [Prevotella]	1,2870±0,0070	0,8630±0,0031	0,7890±0,0031	0,6505
Deferribacteres				
<i>Mucispirillum</i>	0,0056±0,0003	0,0194±0,0006	0,0109±0,0004	0,9754
Firmicutes				
<i>Lactobacillus</i>	0,0027±0,0002 ^b	0,4021±0,0026 ^a	0,0035±0,0002 ^b	0,0841
<i>Streptococcus</i>	0,0151±0,0005	0,0610±0,0010	0,0071±0,0003	0,8391
<i>Turicibacter</i>	0,1079±0,0013	0,0174±0,0005	0,0099±0,0004	0,6865
Clostridiales Other Other	0,2905±0,0022	0,4174±0,0026	0,1829±0,0017	0,7529
Clostridiales __ __	0,4331±0,0027	0,3680±0,0025	0,4567±0,0028	0,9696
Clostridiaceae Other	0,1751±0,0017	0,2094±0,0019	0,3048±0,0023	0,8914
Clostridiaceae __	2,6406±0,0065	2,7302±0,0067	2,5304±0,0064	0,9768
<i>Clostridium</i>	18,1853 ^b ±0,0158	24,5132 ^a ±0,0176	25,0432 ^a ±0,0177	0,0059
<i>Pseudoramibacter Eubacterium</i>	0,0410±0,0008	0,0204±0,0006	0,0044±0,0003	0,9024
Lachnospiraceae Other	0,5472±0,0030	0,8397±0,0037	0,8006±0,0036	0,8033
Lachnospiraceae__	3,7693±0,0078	3,4026±0,0074	4,9749±0,0089	0,3603
<i>Blautia</i>	7,1217 ^b ±0,0105	10,8698 ^a ±0,0127	9,6983 ^{ab} ±0,0121	0,0667
<i>Coprococcus</i>	0,0729±0,0011	0,1345±0,0015	0,1976±0,0018	0,8358
<i>Dorea</i>	2,4036±0,0063	3,7899±0,0078	3,8988±0,0079	0,2579
<i>Roseburia</i>	0,0311±0,0007	0,0075±0,0004	0,0174±0,0005	0,9543
[Ruminococcus]	2,9296±0,0069	4,3782±0,0084	4,3139±0,0083	0,3235
<i>Peptococcus</i>	0,9557±0,0040	1,2992±0,0046	0,7002±0,0034	0,5734
Peptostreptococcaceae __	0,5377±0,0030	0,2367±0,0020	0,3648±0,0025	0,6946
Ruminococcaceae __	1,6393±0,0052	1,4883±0,0049	1,5261±0,0050	0,9762
<i>Faecalibacterium</i>	5,8279±0,0096	4,6500±0,0086	5,3549±0,0092	0,6535

<i>Ruminococcus</i>	0,3000±0,0022	0,1980±0,0018	0,0980±0,0013	0,7235
<i>Megamonas</i>	0,6651±0,0033	0,9798±0,0040	1,9702±0,0057	0,1052
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,2765±0,0021	0,2196±0,0019	0,1511±0,0016	0,8935
[Mogibacteriaceae] ____	0,0383±0,0008	0,0010±0,0001	0,0002667±0,0001	0,8000
Erysipelotrichaceae ____	2,8252±0,0068	2,3827±0,0062	2,1988±0,0060	0,7750
<i>Allobaculum</i>	6,9052 ^a ±0,0104	3,8502 ^b ±0,079	3,9959 ^b ±0,0080	0,0265
<i>Catenibacterium</i>	0,4555±0,0027	1,0138±0,0041	1,0160±0,0041	0,4300
<i>Clostridium</i>	0,0244±0,0006	0,0185±0,0006	0,0206±0,0006	0,9975
<i>Coprobacillus</i>	0,0557±0,0010	0,1832±0,0017	0,0161±0,0005	0,5815
[Eubacterium]	0,7807±0,0036	1,6966±0,0053	0,9062±0,0039	0,2840
Fusobacteria				
Fusobacteriaceae Other	0,6114±0,0032	0,6430±0,0033	0,6918±0,0034	0,9849
<i>Fusobacterium</i>	24,8876 ^a ±0,0177	17,3190 ^b ±0,0155	16,9283 ^b ±0,0153	0,0006
Proteobacteria				
<i>Sutterella</i>	0,8938±0,0038	0,4872±0,0028	0,3002±0,0022	0,3770
<i>Campylobacter</i>	0,0000±0,0000	0,0511±0,0009	0,0164±0,0005	0,8022
Succinivibrionaceae ____	0,0312±0,0007	0,0043±0,0003	0,2782±0,0022	0,2653
<i>Anaerobiospirillum</i>	1,3284±0,0047	0,8646±0,0038	0,9565±0,0040	0,7132
Enterobacteriaceae ____	0,0244±0,0006	0,1484±0,0016	0,0153±0,0005	0,6069

As médias são seguidas pelo erro padrão; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,10).

4.5 Avaliação da imunidade

Na tabela 9 estão apresentados os resultados de imunofenotipagem de linfócitos, linfoproliferação, índice de fagocitose e burst oxidativo. Pode-se verificar que não houve diferença para os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, relação CD4⁺/CD8⁺, *burst* oxidativo basal e induzido por SAPI e PMA, e resposta proliferativa de linfócitos (p>0,05). Os mesmos parâmetros imunológicos avaliados por Matheus (2016) em gatos, não apresentaram diferença com a adição de leveduras com metabólitos ativos. Da mesma forma, os índices de imunidade não foram afetados pelos *blends* com ou sem PCL no estudo com cães de Middelbos et al. (2007b). Grieshop et al. (2004) observaram redução de linfócitos nos tratamentos com MOS e MOS + chicória em cães. Por outro lado, no estudo de Swanson et al. (2002a) a porcentagem total de células brancas aumentou com MOS. Assim com no estudo de Pawar et al. (2017), a porcentagem de subpopulações de linfócitos CD4⁺ e a proporção de CD4⁺:CD8⁺ foram maiores no grupo de cães suplementados com MOS..Segundo VOGT (2005), o aumento de

linfócitos circulantes pode ser decorrente do estímulo causado pela presença de PCL no lúmen intestinal. O mananoglicosacarídeo contido na PCL de *Saccharomyces cerevisiae* foi apontado como agente capaz de desencadear fortes estímulos antigênicos (BALLOU, 1970). Os mananoglicosacarídeos podem, também, estimular a resposta imune contra patógenos específicos e assim, impedir sua colonização no intestino e realizar sua apresentação ao sistema imune como antígenos atenuados (FERKET, 2004).

Tabela 9. Resultados da imunofenotipagem de linfócitos, teste de fagocitose, proliferação e burst oxidativo dos cães alimentados com as dietas experimentais

Item	Dietas ¹			EPM ²	Valor de <i>p</i>
	DC	LMA 0,3	LMA 0,6		
CD4+ % (linfócitos T auxiliares)	28,66	28,33	28,83	1,28	0,96
CD8+ % (linfócitos T citotóxicos)	15,16	14,33	16,83	0,87	0,15
CD4+/CD8+	6,26	2,16	1,56	1,77	0,16
Burst oxidativo basal	216,17	206,5	196,83	8,00	0,26
Burst oxidativo SAPI ³	497,83	575,83	507	29,45	0,15
Burst oxidativo PMA ⁴	764,33	778	774,67	60,51	0,98
Índice de fagocitose	264,67 ^b	295,17 ^a	297,17 ^a	7,38	0,01
Índice de Proliferação	310,33	355,5	356,17	16,14	0,10

¹DC (dieta controle), LMA 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LMA 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos); ²EPM, erro padrão da média; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); SAPI, células estimuladas, in vitro, com *Staphylococcus aureus*, marcado com iodeto de propídeo; PMA, neutrófilos induzidos por acetato de forbol miristato.

Rutherford-Markwick et al. (2013) encontraram aumento significativo de resposta proliferativa de linfócitos e aumento da atividade fagocitária periférica em gatos alimentados com uma dieta suplementada com nucleotídeos derivados de levedura. No presente estudo, o índice de fagocitose foi maior nas dietas com adição da levedura ($P < 0,05$) em relação a controle, o que demonstra possível ação indireta do prebiótico (MACFARLANE & CUMMINGS, 1999). Sugere-se que a manose presente na superfície destes compostos possa estimular a produção de uma lectina que se liga a manose, com importante função de auxiliar a fagocitose, fundamental na resposta imune inata aos microrganismos (SPRING et al., 2000).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os teores de inclusão de levedura com metabólitos ativos e os parâmetros avaliados neste estudo, o aditivo pode apresentar possível efeito na imunidade inata e inespecífica. Além de modestas mudanças nas comunidades da microbiota fecal de cães adultos saudáveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C.A. Carbohydrates Nutricines: Non-digestible oligosaccharides. In: _____. **Nutricines - Food Components in Health and Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.

ADAMSON, E. J.; SLOCOMBE, R. F. Flow cytometric studies of equine phagocytes following strenuous exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, p. 37-42, 1995.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

AMBROZINI, S.R. Formulação comercial de alimentos para cães e gatos: uma visão a partir da construção do rótulo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 6º, 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2007. p.65-70.

APANAVICIUS, C. J.; POWELL, K. L.; VESTER, B. M.; KARR-LILIENTHAL, L. K.; POPE, L. L.; FASTINGER, N. D.; WALLIG, M. A.; TAPPENDEN, K. A.; SWANSON, K. S. Fructan supplementation and infection affect food intake, fever, and epithelial sloughing from *Samnonella* challenge in weanling puppies. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1923-1930, 2007.

AQUINO, A. A. **Extrato seco de parede de levedura em dieta para gatos adultos**. 2009. 171 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

AQUINO, A. A.; ALVES, M. P.; SANTOS, J. P. F.; FELICIANO, M. A. R.; PICCOLI, R. H., & FLÁVIA, M. D. O. Efeitos do extrato de parede de levedura em dieta seca sobre a microbiologia, ácidos graxos de cadeia curta e redução do odor das fezes de gatos adultos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 479-486, 2012.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. AAFCO. **Official publication 2009**, Washington, 2009.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. Official and tentative methods of analysis. 16. ed. Arlington, **AOAC International**, 1995.

BALLOU, C.E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **Journal of Biological Chemistry**, v.245, n.5, p.1197-1203, 1970.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 10, p. 341-346, 1995.

BARRY, K. A.; HERNOT, D. C.; MIDDELBOSS, I. S.; FRANCIS, C.; DUNSFORD, B.; SWANSON, K. S.; FAHEY Jr., G. C. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3244-3252, 2009.

BARRY, K. A.; WOJCICKI, B. J.; MIDDELBOSS, I. S.; VESTER, B. M.; SWANSON, K. S.; FAHEY Jr., G. C. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 9, p. 2978-2987, 2010.

BARRY, K. A.; MIDDELBOSS, I. S.; VESTER BOLER, B. M. V.; DOWD, S. E.; SUCHODOLSKI, J. S.; HERISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WHITE, B. A.; FAHEY JR.; SWANSON, K. S. Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 12, p. 5924-5933, 2012.

BELOSHAPKA, A. N.; WOLFF, A. K.; SWANSON, K. S. Effects of feeding polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end products in healthy adult dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 4, p. 638-644, 2012.

BLACHIER, F. et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 547-562, 2007.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 41, n. 1, p. i11-i16, 2002.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 33-41, 1999.

BOVER-CID, S.; HUGAS, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 185-189, 2001.

BOYE, J.; BETTONI, R. W.; BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. S183-S211, 2012.

BROWN, G. D.; GORDON, S. A new receptor for β - glucans. **Nature**, London, v. 413, n. 1, p. 36-36, 2001.

BUDDINGTON, R.K.; BUDDINGTON, K.K.; SUNVOLD, G.D. The use of fermentable fibers to manage the gastrointestinal tract. In: REINHART, G.A., CAREY, D.P. **Recent advances in canine and feline nutrition**, Wilmington: Orange Frazer Press, 2000. p.169-181.

BUENO, A. R.; CAPPEL, T. G.; SUNVOLD, G. D.; MOXLEY, R. A.; REINHART, G. A.; & CLEMENS, E. T. Feline colonic microbes and fatty acid transport: effects of feeding cellulose, beet pulp and pectin/gum arabic fibers. **Nutrition research**, v. 20, n. 9, p. 1319-1328, 2000.

BUTOLO, J. E. Uso da levedura desidratada na alimentação de aves, 1997. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: CBNA, 1997. p. 51-83.

CAMPOS NETO, O. Utilização dos subprodutos da indústria sucroalcooleira na alimentação animal. In: Simpósio sobre produção animal, 4, 1987, Brasília, DF. **Anais Simpósio sobre Produção Animal Brasília**, DF: SBZ, 1987. p.129-152.

CAPORASO, J.G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**. v. 7, n. 5, p. 335–6, 2010a.

CAPORASO, J.G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**. v. 6, n.8, p.1621-1624, 2012b.

CARBONERA, N.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P. Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação da anchoita (*Engraulis anchoita*) fermentada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 201-207, 2010.

CARCIOFI, A.C. Emprego de fibras em alimentos para cães e gatos. In.: Simpósio sobre nutrição de animais de estimação, 5º, 2005, Campinas. **Anais...**Campinas: CBNA, 2005. p.95-108.

CARCIOFI, A. C., TAKAKURA, F. S., DE-OLIVEIRA, L. D., TESHIMA, E., Jeremias, J. T., BRUNETTO, M. A., & PRADA, F. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response*. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 326-336, 2008.

CARROL, I. M.; CHANG, Y.; PARK, J.; SARTOR, R. B.; RINGEL, Y. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Gut Pathogens**, v. 2, n. 19, p. 1-9, 2010.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Universidade de Campinas, UNICAMP. Campinas, SP. 2003.208p.

CHO, S.; HWANG, O.; PARK, S. Effect of dietary protein levels on composition of odorous compounds and bacterial ecology in pig manure. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 9, p. 1362–1370, 2015.

COSTELLO, B. DE L.; RATCLIFFE, N. M. Volatile Organic Compounds (VOCs) Found in Urine and Stool. In: AMANN, A. S.; COSTELLO, B. DE L.; RATCLIFFE, N. M. **Volatile Biomarkers**. Frenchay; United Kingdom. Elsevier, 2013.

CRITTENDEN, R.; PAYNE, M.J. Nutrition News. Facts and functions of prebiotics, probiotics and synbiotics. May 2008. **Department of Human Nutrition, K-State Research**

and Extension, Kansas State University; Prebiotics. In: Lee YK, Salminen S, eds. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. Wiley-Interscience, 2nd ed; 2008: Chapter 4, p 535-582.

CUMMINGS, J.H.; HILL, M.J.; BONES, E.S.; BRANCH, W.J.; JENKINS, D.J.A. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.32, p. 2094- 2101, 1979.

da SILVA, L. P., & NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n.5, p. 983-990. 2003.

den BESTEN, G.; van EUNEN, K.; GROEN, A. K.; VENEMA, K.; RIJNGOUD, D., BAKKER, B. M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipids Research**, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 6-17, 2015.

DEUSCH, O.; O'FLYNN, C.; COLYER, A.; MORRIS, P.; ALLWAY, D.; JONES, P. G.; SWANSON, K. S. Deep Illumina-Based Shotgun Sequencing Reveals Dietary Effects on the Structure and Function of the Fecal Microbiome of Growing Kittens. **PLOS One**, v. 9, n. 7, p. 1-15, 2014.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1768–1771, 1961.

FAHEY, G.C. Research needs companion animal nutrition. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. **Pet food technology**. Mt. Morris:Illinois, 2003, p. 135-140.

FABER, T. A.; HOPKINS, A. C.; MIDDELBOSS, I. S.; PRICE, N. P.; FAHEY JR., G. C. Galactoglucomannan oligosaccharide supplementation affects nutrient digestibility, fermentation end-product production, and large bowel microbiota of the dog. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 1, p. 103-112, 2011.

FÉLIX, A. P.; ZANATTA, C. P.; BRITO, C. B. M.; MURAKAMI, F. Y.; FRANÇA, M. I.; MAIORKA, A.; FLEEMING, J. S.; Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminosilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 31-35, 2010.

FERKET, P. R. Raising drug-free poultry-What are the alternatives. In: **Proc. 29th Annual Poultry Service Industry Workshop. Banff, Alberta Canada, October**. 2004. p. 5-7.

FIGUEIREDO, T. C. **Características físico-química e microbiológica aminas bioativas em ovos de consumo**. 2008, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FISCHER, M. M.; KESSLER, A. M.; SÁ, L. R. M.; VASCONCELLOS, R. S.; ROBERTI FILHO, F. O.; NOGUEIRA, S. P.; OLIVEIRA, M. C. C.; CARCIOFI, A. C. Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 7, p. 2233-2245, 2012.

FLEET, G. H. Cell walls. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast organelles**. London: Academic Press. 1991. Cap. 5, p. 199-277.

FLICKINGER, E. A.; SCHREIJEN, E. M. W. C.; PATIL, A. R.; HUSSEIN, H. S.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR.; G. C. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 8, 2008-2018, 2003.

FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom Knows Best: the universality of maternal microbial transmission. **PLOS Biology**, v. 11, n. 8, p. 1-9, 2013.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. 2008. 100f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GARCIA-MAZCORRO, J. F.; MINAMOTO, Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 45, n. 2, p. 111-124, 2013.

GARCIA-MAZCORRO, J. F.; BARCENAS-WALLS, J. R.; SUCHODOLSKI, J. S.; & STEINER, J. M. Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing **PeerJ**, v. 5, p. e3184, 2017.

GARNER, C. E. et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. **FASEB Journal** v. 21, n. 8, p. 1675–88, 2007.

GERMAN, A. J.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Analysis of leukocyte subsets in the canine intestine. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 129–145, 1999.

GIBSON G. R., ROBERFROID M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Pre+biotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p.1401-12, 1995

GOMES, M. O. S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 2009. 79p. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal/SP.

GREETHAM, H. L.; GIFFARD, C.; HUTSON, R. A.; COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Bacteriology of the labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 640–646, 2002.

GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BRUCE, K. J.; PATIL, A. R.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L.; FAHEY JR, G. C.. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and man- nan-oligosaccharides. **Arch. Animal Nutrition**. V. 58, p.483–493. 2004.

GRZESKOWIAK, L.; ENDO, A.; BEASLEY, S.; SALMINEN, S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v. 34, p. 14-23, 2015.

HANDL, S.; DOWD, S. E.; GARCIA-MAZCORRO, J. F.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, p. 301-310, 2011.

HAND, D.; WALLIS, C.; COLYER, A.; PENN, C. W. Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. e53115, 2013.

HEILIG, H. G. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus spp.* and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 68, p. 114-123, 2002.

HENDERSON, L. M.; MOULE, S. K.; CHAPPELL, J. B. The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, n. 1-2, p. 157-162, 1993.

HESTA, M.; JANSSENS, G. P.; DEBRAEKELEER, J.; DE WILDE, R. The effect of oligofructose and inulin on faecal characteristics and nutrient digestibility in healthy cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 85, n. 5-6, p. 135-141, 2001.

HUNTER JUNIOR, K. W.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, Reno, v. 35, n.4, p. 267-271, out. 2002.

HUSSEIN, H. S.; FLICKINGER, E.A.; FAHEY JR., G. C. Petfood applications of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1454-1456, 1999.

HUSSEIN, S. H.; SUNVOLD, G. D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: REINHART, G. A.; CAREY, D. P. **Recent advances in canine and feline nutrition**, Wilmington: Orange Frazer Press, v. 3, p. 153-168, 2000.

HWANG, O. H. et al. Effect of Storage Period on the Changes of Odorous Compound Concentrations and Bacterial Ecology for Identifying the Cause of Odor Production from Pig Slurry. **Plos One**, v. 11, n. 9, p. e0162714, 2016.

ICIDCA. Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia**. Brasília: ABIPTI, 1999. p. 49-55, 267-271, 297-301.

INOUE, K.; MINAMI, Y.; TAOKA, Y.; IKATA, T.; FUKUZAWA, K. Phagocytosis and superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: *Frontiers in Reactive Oxygen in Biology and Medicine* (eds Asaka, K. and Yoshikawa, T.) CRC Press: New York, 459-461, 1994.

JIA, J.; FRANTZ, N.; KHOO, C.; GLENN R, G.; RASTALL, R. A.; MCCARTNEY, A. L. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhoea. **FEMS microbiology ecology**, v. 71, n. 2, p. 304-312, 2009.

KANAKUPT, K.; VESTER BOLER, B. M.; DUNSFORD, B. R.; FAHEY Jr., G. C. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1376-1384, 2011.

KERR, K. R.; DOWD, S. E.; SWANSON, K. S. Salmonellosis impacts the proportions of faecal microbial populations in domestic cats fed 1–3-d-old chicks. **Journal of Nutrition Science**, v. 30, n. e3, p. 1-5, 2014.

KROLL, S. F.; **Efeitos da adição de mananoproteínas derivadas da parede celular de leveduras sobre parâmetros imunológicos de cães adultos e idosos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 2014. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal/SP.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Nucleotídeos e ácidos nucléicos. In: _____. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995. cap. 12, p. 242-268.

LOUIS, P.; SCOTT, K. P.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p.1197–1208, 2007.

LOZUPONE C.; KNIGHT R. UNIFRAC: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8228–35. 2005.

LUBBS, D. C.; VESTER, B. M.; FASTINGER, N. D.; SWANSON, K. S. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 93, n. 1, p. 113-121, 2009.

MACARI, M., MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais ...**, Campinas: FACTA, 2000. p.161-174.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v. 18, p.999-1003, 1999.

MACKIE, R. I.; STROOT, P. G.; VAREL, V. H. Biochemical Identification and Biological Origin of Key Odor Components in Livestock Waste. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 5, p. 1331–1342, 1998

MALINEN, E.; KASSINEN, A.; RINTTILA, T.; PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted

oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 269-277, 2003.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M. F.; ANGELI, J. P.; OLIVEIRA, R. J.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R. Beta-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 658, n. 3, p. 154-161, mar./abr. 2008.

MARTINS, M. S.; **Leveduras de cerveja e cana-de açúcar (s *accharomyces cerevisiae*), autolisada e íntegra, na dieta de cães.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 2009.Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal/SP.

MATHEUS, L. F. O. **Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos.** 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências). 2016. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP.

MIDDELBOS, I. S.; GODOY, M. R.; FASTINGER N. D.; FAHEY-JR, G. C. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3022–3032, 2007a.

MIDDELBOS, I. S.; FASTINGER, N. D.; FAHEY JR., G. C. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 11, p. 3033-3044, 2007b.

NAM, Y. D.; JUNG, M. J.; ROH, S. W.; KIM, M. S.; BAE, J. W. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22109, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **The Scientific Basis for Estimating Emissions from Animal Feeding Operations.** Washington, DC.: National Academy Press, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, D.C: **National Academy of Science, National Academy Press**, p. 398, 2006.

NEESER, J.R.; KOELLREUTTER, B.; WUERSCH, P. Oligomannosidetype glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins. **Infect Immun.** V.52, p. 428–436, 1986.

OFEK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature.** v.265, p. 623–625, 1977.

O'TOOLE, P. W., & COONEY, J. C. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v.2008. 2008.

PANASEVICH, M. R.; KERR, K. R.; DILGER, R. N.; FAHEY, G. C.; GUÉRIN-DEREMAUX, L.; LYNCH, G. L.; ... & SWANSON, K. S. Modulation of the faecal

microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 1, p. 125-133, 2015.

PAWAR, M. M.; PATTANAIK, A. K.; SINHA, D. K.; GOSWAMI, T. K.; & SHARMA, K. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of animal science and technology**, v. 59, n. 1, p. 11, 2017.

PELÍCIA, K.; MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B; PIZZOLANTE, C.C.; TAKAHASHI, S.E; GARCIA, R.G; MOREIRA, J.; PAZ, I.C.L.A; QUINTEIRO, R. R.; KOMIYAMA, C.M.. Probiotic and prebiotic utilization in diets for free-range broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 2004.

PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THUIS, C.; STOBBERINGH, E. E. Quantification of *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 141-147, 2005.

PIER, G. B.; LYCZAK, J. B.; WETZLER, L. M. **Immunology, Infection, and Immunity**. Washington: ASM Press, p. 718, 2004.

PIRES, AL. L.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

POND, W.G; CHURCH, D.C.; POND, K.R. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. 4th ed. John Wiley and Sons; 1995.

PROPST, E. L.; FLINCKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR., G. C. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 12, p. 3057-3066, 2003.

PRYCE, J.D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p.1121-1151, 1969.

RAMOS, G. R. V.; BIRCHAL, V. S.; SEARA, L. M.; PEREIRA, F. D.; ALVISI, P. Caracterização química do autolisado de levedura de alambique e avaliação da aceitabilidade do pão de queijo adicionado do autolisado desidratado. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 3, p. 473-484, 2011.

RIDLON J.M.; KANG D.J. & HYLEMON P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. **Journal Lipidic Research**, v.47, p. 241–259,2006.

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J. A.; GIBSON, G. R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **The Journal of nutrition**, v. 128, n.1, p.11-19, 1998.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to Prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, p. S105-S110, 2002.

ROUDEBUSH, P.; DAVENPORT, D. J.; REMILLARD, R. L. Flatulence. In: HAND, M. S. et al. **Small Animal Clinical Nutrition**. 5th. ed. Topeka Kansas: Mark Morris Institute, 2010.

RODRÍGUEZ, J. M.; MURPHY, K.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; KOBER, O. L.; JUGE, N.; AVERSHINA, E.; RUDI, K.; NARBAD, A.; JENMALM, M. C.; MARCHESI, J. R.; COLLADO, M. C. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Healthy & Disease**, v. 26, p. 1-17, 2015.

ROUND, J.L., MAZMANIAN, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**. 9:313-323.

RUTHERFURD-MARKWICK, K. J.; HENDRIKS, W. H.; MOREL, P. C.; THOMAS, D. G.; The potential for enhancement of immunity in cats by dietary supplementation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 3, p. 333-340, 2013.

SANTOS, J. P. F. **Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos**. 2015. 91 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

SAS Institute Inc. **SAS User's guide: statistics**. Ver. 9.1.1, SAS Inst., Cary, NC, 2004.

SHABALY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SILVA, V.K. **Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas**. 2006. 151f. Dissertacao (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SILVA, B. J. G. **Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica**. Dissertação (Mestrado em Química). 2007. 94f. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8. ed. São Paulo: **Thomson**. 2005. 999 p.

SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D.; VILELA, E. S.; BALDINI, V. L. S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas. v. 21, n. 1/2, p. 119-125, 1999.

SPARKERS, A. H.; PAPASOULIOTIS, K.; SUNVOLD, G.; WERRETT, G.; GRUFFYDD-JONES, E. A.; EGAN, K.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; REINHART, G. Effect of dietary supplementation with fructo-oligosaccharides on fecal flora of healthy cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 4, p. 436-440, 1998.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and concentrations of enteric bacteria in ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.205-211, 2000.

STERCOVA, E.; KUMPRECHTOVA, D.; AUCLAIR, E.; & NOVAKOVA, J. Effects of live yeast dietary supplementation on nutrient digestibility and fecal microflora in beagle dogs. **Journal of animal science**, v. 94, n. 7, p. 2909-2918, 2016.

STOKES, C.; WALY, N. Mucosal defense along gastrointestinal tract of cats and dogs. **Veterinary Research**, v. 37, p. 281-293, 2006

STONE, C. W. Yeast Products in the Feed industry. A practical Guide for Feed Professionals. [http](http://). 2006.

STRICKLING, J. A.; HARMON, D. L.; DAWSON, K. A.; GROSS, K. L. Evaluation of oligosaccharide addition to dogs diets: influence on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3-4, p. 205-219, 2000.

SUCHODOLSKI, J. S. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, v. 89, n. 5, p. 1520-1530, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S.; MARKEL, M. E.; GARCIA-MAZCORRO, J. F.; UNTERER, S.; HEILMANN, R. M.; DOWD, S. E.; ... & STEINER, J. M. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51907, 2012.

SWANN, J. R.; WANT, E. J.; GEIER, F. M.; SPAGOU, K.; WILSON, I. D.; SIDAWAY, J. E.; ... & HOLMES, E. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4523-4530, 2011.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER L. L.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR., G. C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal Nutrition**. V.132, p. 980–989. 2002a.

SWANSON, K.; GRIESHOP, C.; FLICKINGER, E.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R., ... & FAHEY JR, G. C. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 309-318, 2002b.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; MERCHEN, N. R., & FAHEY, G. C. Effects of supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides on colonic microbial populations, immune function and fecal odor components in the canine. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1717S-1719S, 2002c.

SWANSON, K.S.; FAHEY, G.C. Jr. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. In: **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, p.19-35, 2007.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: falta editora, p. 35-60, 2003.

THUM, C.; COOKSON, A. L.; OTTER, D. E.; McNABB, W. C.; HODGKINSON, A. L.; DUER, J.; ROY, N. C. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota Influence the Development of the Infant Gastrointestinal Tract? **Journal of Nutrition**, 142, n. 11, p. 1921-1928, 2012.

TZORTZIS, G.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Canine functional foods. **Food Science and Technology Bulletin** , v. 1, p.1-11, 2003.

URREGO, M. I. G. **Digestibilidade, produtos da fermentação e compostos voláteis nas fezes de cães Bulldog francês alimentados com diferentes fontes proteicas** Dissertação (Mestrado em Ciências). 2017. 71p. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP.

VALE, S. R.; GLORIA, M. B. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**. v. 80, p.1006-1012, 1997.

VICKERS, R. J.; SUNVOLD, G. D.; KELLEY, R. L.; REINHART, G. A. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. **American Journal Veterinary Research**. v. 62, p. 609–615, 2001.

VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. 1980. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1980.

VOGT, L.K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 151f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre, 2005.

WALKER, W. A.; DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9. p. 668–675, 1998.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W. Detection of *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2578-2585, 2001.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; PERDOMO, D. M. X.; Biological response of rats to resistant starch. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 252-257, 2005.

WANG, R.; CAO, W.; FRANKLIN, W.; CAMPBELL, W.; CERNIGLIA, C. E. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 2, p. 131-138, 1994.

WENK, C. Prebiotics in companion animals. In: **Recent advances in pet nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2006, p.47-55.

WESTWOOD, O. M. R. The scientific basis for health care times mirror international publishers. London: Times Mirror Internacional, 1999. 616 p

ZAINE, L. **Avaliação do efeito de derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar** (*saccharomyces cerevisiae*) sobre a resposta imune de cães adultos. 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal/SP.

ZAINE, L.; MONTI, M.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. C. Nutracêuticos imunomoduladores com potencial uso clínico para cães e gatos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4Supl, p. 2513-2530, 2014.

ZENTEK, J.; MARQUAT, B.; PIETRZAK, T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1682-1684, 2002.